

Röntgenuntersuchungen an kolloidalen Arzneiformen

am Beispiel von:
Oberflächenmodifizierten Lipidnanopartikeln
und Quil A-Assoziaten

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Meike Harms
aus Braunschweig

1. Referentin:	Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann
2. Referentin:	Prof. Dr. Heike Bunjes
eingereicht am:	22.10.2007
mündliche Prüfung (Disputation) am:	14.02.2008

Druckjahr 2008

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Schubert, M.A., Harms, M. & Müller-Goymann, C.C. Structural investigations on lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 27: 226-236 (2006).

Tagungsbeiträge

Harms, M., Schubert, M.A. & Müller-Goymann, C.C. X-Ray characterization of aqueous lipid nanodispersions. (Poster) International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Nürnberg (2004).

Harms, M., Paepenmüller, T. & Müller-Goymann, C.C. Small Angle X-Ray Scattering Investigation on the Pseudo-binary System Cholesterol and Quillaja Saponin. (Poster) 5th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Genf (2006).

Harms, M., Paepenmüller, T., Garamus, V.M. & Müller-Goymann, C.C. Small-angle neutron scattering (SANS) of Quil A micelles. (Poster) 3. Zsigmondy Kolloquium, Berlin (2006).

Harms, M., Schubert, M.A. & Müller-Goymann, C.C. Surface Modified Solid Lipid Nanoparticles. (Poster) Particles 2006, Orlando (2006).

Harms, M., Schubert, M.A., Friedrich, I., Müller-Goymann, C.C. Formation of reverse micellar type versus surface modified solid lipid nanoparticles. (Vortrag) Particles 2006, Orlando (2006).

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann am Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Frau Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann

danke ich herzlich für die Zuweisung des Themas, die Unterstützung bei der Bearbeitung sowie die ständige Diskussionsbereitschaft.

Frau Prof. Dr. Heike Bunjes danke ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für das angenehme Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit und die zahlreichen Hilfestellungen und fachlichen Diskussionen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Dazu gehören insbesondere Dr. Martin Schubert und Timo Paepenmüller für die gute Zusammenarbeit bei der Untersuchung ihrer Formulierungen, Frau Jahn für die vielen Stunden im Röntgenraum und Dr. Stefan Mackeben für die Einführung in die Methoden der Röntgenkleinwinkelstreuung.

Dr. Vasyl M. Haramus danke ich für die Möglichkeit, am GKSS-Forschungszentrum Geesthacht GmbH SANS-Messungen durchzuführen, die dabei erhaltene Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Dr. Lutz Preu vom Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig danke ich für die Durchführung der Molecular Modelling-Berechnungen.

Dem Institut für Pflanzenbiologie sowie dem Institut für Metallphysik und Nukleare Festkörperphysik der TU Braunschweig, danke ich für die Möglichkeit Untersuchungen am TEM durchzuführen.

Dem Institut für Anorganische und Allgemeine Chemie danke ich für die Durchführung der NMR-Messungen.

Weiterhin danke ich dem Institut für Pharmazeutische Chemie für die Durchführung der IR-Messungen.

Dem Elektronenmikroskopischen Zentrum der Friedrich-Schiller-Universität Jena danke ich für die Möglichkeit, Cryo-TEM Aufnahmen zu machen.

Ferner möchte ich mich bei den im Material und Methoden-Teil aufgeführten Firmen für die freundliche Überlassung von Materialien bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Röntgenbeugung und -streuung	4
2.1	Röntgenstreuung	4
2.1.1	Entstehung des Streubildes	4
2.1.2	Die inverse Fouriertransformation (ITP)	6
2.1.3	Streumassenradius nach Guinier	8
2.1.4	Streuung eines Zylinders	9
2.2	Röntgenbeugung	10
3	Oberflächenmodifizierte Lipidnanopartikel	12
3.1	Allgemeiner Teil	12
3.1.1	Entwicklung von festen Lipidnanopartikeln	12
3.1.2	Eigenschaften von SLN und NLC	13
3.1.3	Herstellung von SLN	15
3.2	Material und Methoden	17
3.2.1	Material	17
3.2.2	Methoden	19
3.2.2.1	Herstellung der Systeme	19
3.2.2.2	Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXD)	20
3.2.2.3	Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)	21
3.2.2.4	Partikelgrößenbestimmung	21
3.2.2.5	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	22

3.2.2.6	NMR-Spektroskopie	22
3.2.2.7	IR-Spektroskopie	22
3.3	V Versuchsergebnisse und Diskussion	23
3.3.1	Partikelgröße	23
3.3.2	TEM	25
3.3.3	SAXD	27
3.3.4	SAXS	29
3.3.5	NMR	34
3.3.6	IR	40
3.4	Abschlussdiskussion	44
3.4.1	Kristallstruktur des Hartfetts	44
3.4.2	Lokalisation von Lecithin	44
3.4.3	Lokalisation von Solutol	46
3.4.4	Modellvorstellung	47
3.5	Zusammenfassung	48
4	Struktur von Quil A-Assoziaten	49
4.1	Allgemeiner Teil	49
4.1.1	Saponine	49
4.1.2	Quil A	50
4.1.2.1	ISCOMs und andere kolloidale Strukturen mit Quil A	53
4.2	Material und Methoden	56
4.2.1	Material	56
4.2.2	Methoden	58
4.2.2.1	Herstellung der Systeme	58
4.2.2.2	Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)	59
4.2.2.3	Neutronenkleinwinkelstreuung (SANS)	61
4.2.2.4	Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)	62
4.2.2.5	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	62

4.2.2.6	Cryo-TEM	62
4.2.2.7	Molecular Modelling	62
4.3	Versuchsergebnisse und Diskussion	63
4.3.1	Aufbau von Quil A-Mizellen	63
4.3.1.1	Molecular Modelling	63
4.3.1.2	PCS	64
4.3.1.3	SANS	65
4.3.1.4	SAXS	72
4.3.2	Solubilisation von Cholesterol	76
4.3.2.1	Molecular Modelling	76
4.3.2.2	PCS	77
4.3.2.3	TEM	78
4.3.2.4	Cryo-TEM	82
4.3.2.5	SANS	83
4.3.2.6	SAXS	88
4.3.2.7	Chargenkonformität von QA	89
4.3.2.8	Lagerung des QA	93
4.3.3	Solubilisation von Cholesterolderivaten	96
4.3.3.1	TEM	97
4.3.3.2	SAXS	98
4.3.4	Solubilisation von Cholesterol durch Dialyse	99
4.3.4.1	SAXS	100
4.3.5	Liposomen und Quil A	103
4.3.5.1	PCS	103
4.3.5.2	TEM	104
4.3.5.3	SAXS	105
4.3.6	Pseudoternäre Mischungen und ISCOM-Matrices	106
4.4	Abschlussdiskussion	107
4.4.1	Interaktion von Quil A mit Cholesterol	107

4.4.1.1	Modellvorschläge für die Bildung der Helix	108
4.4.1.2	Interaktion von Quil A mit Cholesterolderivaten . . .	110
4.4.1.3	Einfluss von Verunreinigungen	110
4.4.2	Interaktion von Quil A mit Liposomen	111
4.4.3	Interaktion von Quil A mit Phospholipid	112
4.5	Zusammenfassung	113
5	Zusammenfassung	114
	Literaturverzeichnis	116

Kapitel 1

Einleitung

Kolloidale Arzneiformen enthalten Partikel in der Größenordnung von 10 – 400 nm. Zu ihnen gehören zum Beispiel Mizellare Lösungen und Liposomen. Die physikochemischen Eigenschaften der Partikel beeinflussen pharmazeutisch wichtige Parameter wie die Wirkstofffreisetzung, Beladungskapazität, Haltbarkeit und Toxizität der Formulierung. Aus diesem Grund ist die physikochemische Charakterisierung der Systeme ein sehr wichtiger Punkt in der Entwicklung. Diesem Punkt kommt noch eine größere Bedeutung hinzu, wenn man bedenkt, dass sich die physikochemischen Eigenschaften von Kolloiden aufgrund der geringen Partikelgröße stark von denen des Bulkmaterials unterscheiden können [1].

Insbesondere in Bezug auf die Charakterisierung kolloidaler Arzneiformen stellt Röntgen- ebenso wie Neutronenstreuung ein sehr mächtiges Werkzeug dar. Aufgrund der kurzen Wellenlänge der eingesetzten Strahlung können hiermit Informationen über Größe und Form von Kolloiden erhalten werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten zwei kolloidale Beispielsysteme näher charakterisiert werden. Ein Schwerpunkt wurde dabei auf den Einsatz von Röntgenstreuung und -beugung gelegt. Als Beispielsysteme wurden eine Nanosuspension in Form der „oberflächenmodifizierten Lipidnanopartikel“ und ein mizellares System, die „Quil A-Assoziate“, gewählt.

Oberflächenmodifizierte Lipidnanopartikel

Feste Lipidnanopartikel stellen eine Alternative zu Emulsionen und Liposomen dar [2, 3]. Sie bieten unter anderem die Möglichkeit, Wirkstoff über einen verlängerten Zeitraum freizusetzen [4].

Aufgrund der kristallinen Struktur der Matrices, die meistens aus Triglyceriden bestehen, ist die Beladungskapazität der Partikel jedoch oft gering [5]. Um dieses Problem zu lösen, gibt es unterschiedliche Ansätze. Eine Möglichkeit beschreiben Friedrich und Müller-Goymann, die durch die Einarbeitung von Lecithin in die Matrix eine Erhöhung der Beladungskapazität erreichen [6, 7]. Dieser Effekt wird der Bildung einer erstarrten invers mizellaren Lösung zugeschrieben. Um diese während der Homogenisation zu erhalten, führen sie eine schmelzpunktnahe Hochdruckhomogenisation durch.

Weitere Arbeiten in der Gruppe um Müller-Goymann beschäftigten sich ebenfalls mit lecithinhaltigen Nanopartikeln. In diesen Arbeiten wurden die Partikel jedoch mittels Hochdruckhomogenisation bei Temperaturen über dem Schmelzpunkt der Lipide durchgeführt [8, 9, 10, 11]. Aufgrund des Vorliegens einer Emulsion während der Herstellung kann es leicht zur Diffusion des Lecithins aus der Matrix in die Grenzfläche der Partikel oder in das Dispersionsmittel kommen.

Ziel dieses Teils der Arbeit war es, den Aufbau der resultierenden Lipidnanopartikel zu untersuchen und festzustellen, ob eine Bildung zusätzlicher Assoziate durch das Austreten von Lecithin aus der Matrix erfolgt.

Quil A-Assoziate

Quillaja-Saponine sind oberflächenaktive Substanzen, die mittels wässriger Extraktion aus dem Seifenrindenbaum (*Quillaja saponaria* molina) gewonnen werden. Aufgrund ihrer immunstimulierenden Wirkung haben sie ein großes Interesse hervorgerufen [12].

Chemisch bestehen sie aus einem Triterpenringgerüst, an das auf beiden Seiten hydrophile Zuckerreste gebunden sind. Sie gehören dementsprechend der Klasse der Bolaamphiphile an und können mizellare Assoziate bilden [13, 14, 15]. Solubilisation von Cholesterol in Phospholipid und Quillaja-Saponin führt zur Bildung von ISCOMs (*immunostimulating complexes*) [15]. Dabei handelt es sich um symmetrische, käfigartige Partikel mit einer Größe von 40 – 100 nm [16]. Neben den ISCOMs werden weitere Assoziate in Form von *wormlike micelles*, *ringlike micelles* und gestapelten Strukturen gebildet.

Modelle zum Aufbau der Assoziate existieren bisher lediglich von Özel et al. sowie Kersten et al., die beide auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen basieren [16, 17]. Neben der Elektronenmikroskopie wurden bisher fast ausschließlich Partikelgrößenanalysen mittels dynamischer Lichtstreuung durchgeführt. Tiefergehende

physikochemische Betrachtungen fehlen fast vollständig. Aus diesem Grund war das Ziel dieses Teils der Arbeit eine Strukturaufklärung der gebildeten Assoziate. Zu diesem Zweck wurden im Wesentlichen Röntgen- und Neutronenkleinwinkelstreuung eingesetzt.

Da die pseudoternären Systeme sehr komplex sind [18], wurde der Schwerpunkt auf das pseudobinäre System Cholesterol mit Quil A, das *wormlike micelles* bildet, gelegt.

Kapitel 2

Röntgenbeugung und -streuung

Eine zentrale Methode dieser Arbeit stellt die Röntgenstrukturanalyse dar. Sie wird eingesetzt, um Informationen über den Aufbau kolloidaler, flüssigkristalliner und kristalliner Systeme zu erhalten. Man unterscheidet zwischen Röntgenbeugung und Röntgenstreuung. In diesem Kapitel sollen beide kurz erläutert werden.

Die dem folgenden Kapitel zugrunde liegende Literatur ist im Wesentlichen: Glatter und Kratky (1982), Kratky (1983) sowie Guinier und Fournet (1955) [19, 20, 21].

2.1 Röntgenstreuung

2.1.1 Entstehung des Streubildes

Die diffuse Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) wird in der Pharmazie eingesetzt, um den Aufbau kolloidaler Systeme wie z. B. Liposomen und Mizellen aufzuklären. Dafür wird die Probe mit Röntgenstrahlen bestrahlt und das entstehende Streubild in Abhängigkeit vom Winkel aufgenommen. Hierbei kommt es zu Streuprozessen zwischen Photonen und Elektronen. Man unterscheidet zwischen zwei verschiedenen Arten der Streuung:

elastische Streuung: Elektronen werden durch die Röntgenstrahlen zum Schwingen angeregt. Diese Energie geben sie in Form von Sekundärwellen wieder ab, die idealerweise die gleiche Wellenlänge wie die eingesetzten Röntgenstrahlen aufweisen. Diese Sekundärwellen interferieren und ergeben das Streubild.

Compton-Streuung: Röntgenstrahlen wechselwirken mit Elektronen der Atomhülle und verlieren dadurch an Energie. Die entstehenden Sekundärwellen

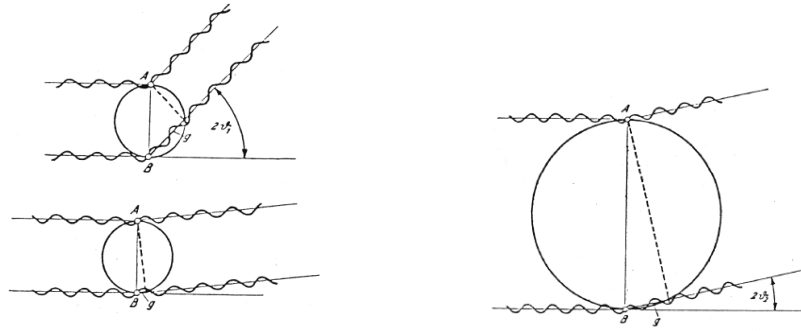


Abb. 2.1: Interferenz von zwei Röntgenstrahlen. Links: Kleiner Partikel bei zwei unterschiedlichen Winkeln. Rechts: Großer Partikel, bei dem bereits bei kleinen Winkeln große Gangunterschiede auftreten [23].

weisen dementsprechend eine längere Wellenlänge auf. Die Compton Streuung stört aufgrund der veränderten Wellenlänge die Messung, stellt jedoch im Kleinwinkelbereich kein wesentliches Problem dar, da sie im Verhältnis zur elastischen Streuung nur einen geringen Anteil ausmacht [22]. Des Weiteren werden messtechnisch nur Röntgenstrahlen erfasst, deren Energie in etwa der Ausgangsenergie entspricht.

Die entstehende Streuintensität (I) eines einzelnen Elektrons in Abhängigkeit vom Winkel (ϑ) wird durch die Thompsonformel beschrieben:

$$I(2\vartheta) = I_0 \cdot \frac{r_e}{a^2} \cdot \frac{1 + \cos^2 2\vartheta}{2} \quad (2.1)$$

Dabei ist I_0 die Primärstrahlintensität, r_e der Elektronenradius und a der Abstand zwischen Probe und Detektor. Bei kleinen Winkeln ist der Term $\cos^2 2\vartheta$ ungefähr gleich 1, demzufolge ist der letzte Teil der Gleichung ebenfalls ungefähr 1. Damit kann die gestreute Intensität durch ein einzelnes Elektron im Kleinwinkelbereich als winkelunabhängig angesehen werden. Da in einer Probe viele Elektronen vorliegen, kommt es zur Interferenz der entstehenden Sekundärwellen.

Abbildung 2.1 soll die Entstehung der Interferenzen verdeutlichen. Der linke Partikel besitzt in etwa die Größe der Wellenlänge der verwendeten Röntgenstrahlen. Treffen zwei Wellen zufällig im Inneren des Partikels auf ein Elektron, senden sie in alle Raumrichtungen Sekundärwellen aus, die interferieren. In der Abbildung wird jeweils die Interferenz zweier parallel laufender Sekundärwellen betrachtet. Im oberen Fall ist ein großer Winkel dargestellt. Durch den längeren Weg des unteren Strahls kommt es zu einem Phasenunterschied zwischen den Strahlen, der eine Auslöschung der Strahlintensität bewirkt (destruktive Interferenz). Im unteren Fall - bei kleinen

Winkeln - kommt es zu einer konstruktiven Interferenz der beiden Strahlen, da der Gangunterschied klein ist im Verhältnis zur Wellenlänge.

Bei großen Partikeln (Abb. 2.1 rechts) tritt bereits bei kleinen Winkeln ein großer Gangunterschied auf, so dass die Winkel, bei denen eine konstruktive Interferenz vorliegt, kleiner sind als bei den zuvor beschriebenen kleinen Partikeln. Der Gangunterschied bei einem bestimmten Winkel ist also vom Abstand r der Elektronen abhängig. Aus dem Gangunterschied ergibt sich die Phasenlage (e^{-ihr}) der interferierenden Strahlen in Abhängigkeit vom Streuwinkel nach folgender von Debye beschriebenen Beziehung [24]:

$$\langle e^{-ihr} \rangle = \frac{\sin(hr)}{hr} \quad (2.2)$$

Dabei ist h der Streuvektor, der sich vom Streuwinkel ableitet:

$$h = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \vartheta \quad (2.3)$$

Die Streukurve eines Partikels ergibt sich aus der Summe der Interferenzen aller im System vorkommenden Elektronenpaare. Die Elektronenabstandsfunktion ($p(r)$, PDDF) beschreibt alle im System vorkommenden Elektronenpaare, da sie die Wahrscheinlichkeit angibt, zwei Elektronen im Abstand r voneinander zu finden. Damit kann die Streufunktion ($I(h)$) bei Kenntnis der PDDF mit folgender Gleichung ermittelt werden [19]:

$$I(h) = 4\pi \int_0^{\infty} p(r) \frac{\sin(hr)}{hr} dr \quad (2.4)$$

Voraussetzung dafür ist, dass das System keine Vorzugsorientierung und keine Fernordnung aufweist. Dies ist bei den in dieser Arbeit vermessenen gering konzentrierten mizellaren und liposomalen Formulierungen der Fall.

Die PDDF ist mit der Streukurve über eine Fouriertransformation verknüpft. Damit ergibt sich, dass Informationen über große Abstände bei kleinen Winkeln und über kleine Abstände bei großen Winkeln zu finden sind.

2.1.2 Die inverse Fouriertransformation (ITP)

Bei Röntgenstreuuntersuchungen ist jedoch im Normalfall die PDDF unbekannt. Es wird lediglich eine Streufunktion gemessen. Aus der Streufunktion kann die PDDF mittels Fouriertransformation berechnet werden:

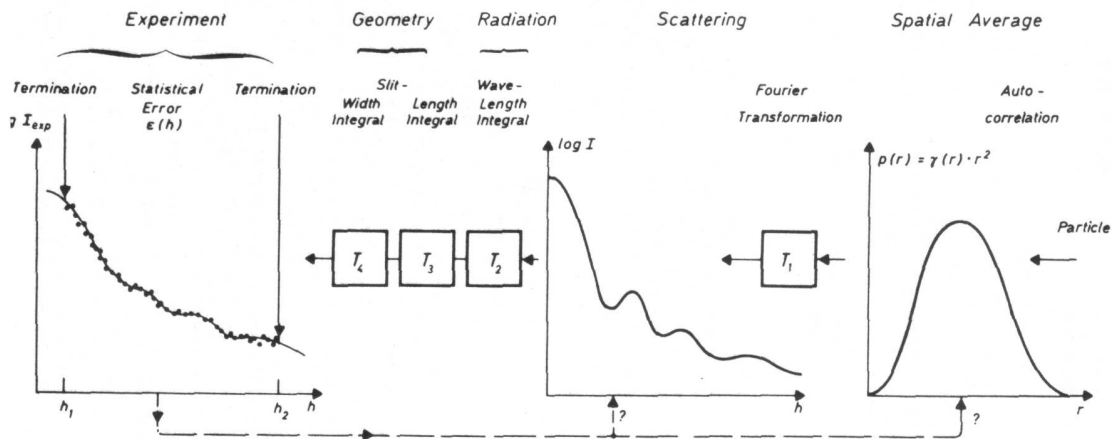


Abb. 2.2: Inverse Fouriertransformation [19]

$$p(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^{\infty} I(h) \cdot hr \cdot \sin(hr) \cdot dh \quad (2.5)$$

Zu diesem Zweck müsste jedoch die gesamte Streufunktion von null bis unendlich messtechnisch zugänglich sein. Insbesondere bei kleinen Winkeln fehlt jedoch ein Großteil der Information. Der Abbruch der Kurve führt durch die Fouriertransformation zu starken Oszillationen in der PDDF. Um dieses Problem zu umgehen, haben Glatter und Kratky die inverse Fouriertransformation (ITP) eingeführt [25].

Es wird zunächst eine theoretische PDDF vorgegeben, die oberhalb einer maximalen Partikelgröße (d_{max} , Abbruchbedingung) gleich Null gesetzt wird. Diese Annahme kann man treffen, da die Partikel eine endliche Ausdehnung haben. Aus dieser Funktion wird mittels Fouriertransformation die theoretische Streukurve berechnet (Abb.: 2.2). Die theoretische PDDF wird dann so lange verändert, bis die sich ergebende Streufunktion möglichst nah an der gemessenen Streukurve ist.

Ein zusätzliches Problem stellt die Verschmierung der gemessenen Streukurve dar. Eine Verschmierung entsteht, wenn kein exakt punktförmiger Strahl monochromatischer Strahlung eingesetzt wird. Eine einfache Fouriertransformation der PDDF führt dementsprechend nicht direkt zur gemessenen Streukurve. Unter Verwendung des Strahllängen-, Strahlweiten- und Wellenlängenprofils wird aus der zuvor berechneten „entschmierten“ Streukurve die „verschmierte“ Streukurve berechnet. In diesem Fall muss also die „verschmierte“ Streukurve möglichst gut der gemessenen Kurve entsprechen. Die Verschmierung durch das Strahlprofil kommt insbesondere bei der

Verwendung einer Kratky-Kamera – wie sie in dieser Arbeit eingesetzt wurde – zum Tragen, da sie ein schlitzförmiges Strahlprofil aufweist.

Die kleinstmögliche Abweichung von der Streukurve ergibt sich, wenn jeder der Messpunkte auf der Kurve liegt. Eine solche Kurve oszilliert jedoch sehr stark, man spricht von einer instabilen Lösung. Um dieses Problem zu umgehen, wird ein Lagrange-Verfahren angewendet [25]. Dabei wird die optimale Lösung zwischen einem geringem Fehler und einer möglichst wenig oszillierenden Funktion ermittelt.

Die bisher besprochene Auswertung entspricht der Auswertung nach der Kugelsymmetrie, das bedeutet, sie liefert als Ergebnis die PDDF des gesamten Partikels, gemittelt über alle drei Raumrichtungen. Liegen zylindrische (z.B. *wormlike micelles*) oder blättchenförmige Strukturen (z.B. unilamellare Liposomen, bei denen der Bilayer als „Blättchen“ angesehen wird) vor, können zusätzlich Informationen über die PDDF des Zylinderquerschnitts bzw. senkrecht durch das Blättchen gewonnen werden. Man spricht von einer Auswertung nach der Zylinder- bzw. Blättchensymmetrie. Um die Kurven zu berechnen, geht man von einem unendlich langen Zylinder bzw. unendlich ausgedehnten Blättchen aus. Der Beitrag dieser Strukturen zur Streuung ist bekannt. Einen weiteren Beitrag zur Gesamtstreu Kurve liefert die Streuung des Querschnitts des Zylinders bzw. der Linie senkrecht durch das Blättchen, wodurch die PDDF nach Zylinder- bzw. Blättchensymmetrie durch eine ITP erhalten werden kann.

Der PDDF liegt die Elektronendichteverteilung ($\rho(r)$) zugrunde. Diese gibt die räumlich gemittelte Elektronendichte über den Abstand r zum Mittelpunkt des Partikels an. Mathematisch verknüpft sind die beiden Funktionen über eine Faltung [19]:

$$p(r) = r^2 \int_{-\infty}^{\infty} \rho(r) \rho(-r) dr \quad (2.6)$$

2.1.3 Streumassenradius nach Guinier

Der Streumassenradius nach Guinier (R_g) ist das mittlere Abstandsquadrat der Elektronen zum Streuzentrum des Partikels. Die Streuung im Bereich sehr kleiner Winkel kann damit wie folgt beschrieben werden:

$$I(h) = I_0 \cdot e^{\left(\frac{-h^2 R_g^2}{3}\right)} \quad (2.7)$$

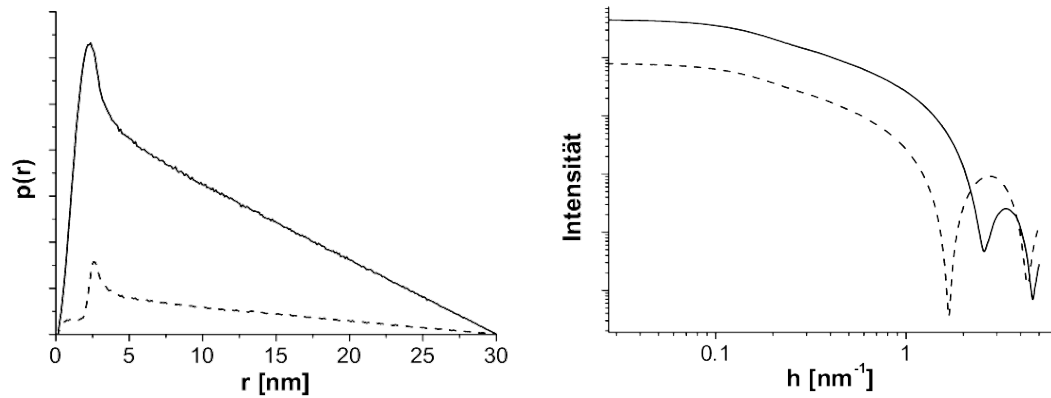


Abb. 2.3: Links: Theoretische PDDF nach Kugelsymmetrie. Rechts: Aus der PDDF berechnete Streufunktion eines Zylinders (durchgezogene Linie: homogener; gestrichelte Linie: inhomogener Zylinder).

Dabei ist I_0 die Streuintensität bei $h = 0$. Trägt man also $\ln(I(h))$ gegen h^2 auf, kann aus der resultierenden Steigung der Geraden bei kleinen Winkeln R_g ermittelt werden. Des Weiteren kann man erkennen, dass die Steigung der Streukurve gegen Null strebt, wenn der Winkel sehr klein im Verhältnis zu R_g wird. Dieses Verhalten nennt man auch Guinierverhalten.

Trägt man $\ln(h \cdot I(h))$ gegen h^2 auf, kann der Streumassenradius des Zylinderquerschnitts und bei Auftragung von $\ln(h^2 \cdot I(h))$ gegen h^2 kann der Streumassenradius der Linie senkrecht durch das Blättchen bestimmt werden.

2.1.4 Streuung eines Zylinders

Man kann mit SAXS Informationen über die Form und Größe der streuenden Objekte erhalten. Dies soll im Folgenden beispielhaft für einen zylindrischen Körper dargestellt werden.

Abbildung 2.3 zeigt die theoretische Streufunktion im Power-Plot (log-log-Plot) sowie die PDDF zweier Zylinder. Die PDDF des homogenen Zylinders weist ein Maximum bei kleinen Abständen auf. Dieses entsteht durch die große Wahrscheinlichkeit, zwei Elektronen mit einem Abstand r kleiner als dem Zylinderdurchmesser zu finden. Der Bereich kleiner Abstände gibt also Informationen über den Zylinderquerschnitt. Es schließt sich ein linear abfallender Bereich an, da die Wahrscheinlichkeit große Abstände innerhalb des Zylinders zu finden mit zunehmendem Abstand immer geringer wird. Der Nulldurchgang am Ende gibt die maximale Ausdehnung, also die Länge des Partikels an. Der Wendepunkt der Kurve gibt eine Auskunft über den Durchmesser des Zylinders.

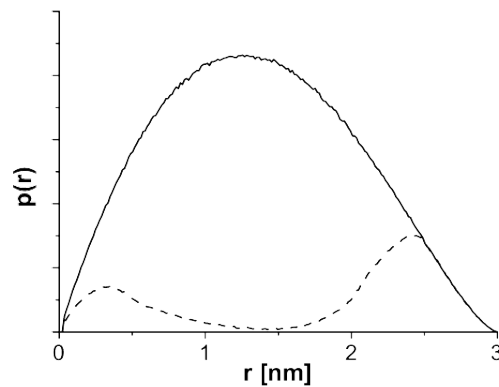


Abb. 2.4: PDDF des Zylinderquerschnitts für einen homogenen (durchgezogene Linie) und einen inhomogenen Zylinder (gestrichelte Linie).

Die Streukurve enthält die Informationen der PDDF im reziproken Raum. Der Guinierradius des Partikels resultiert in einem Guinierverhalten bei kleinen Winkeln. Bei mittleren Winkeln ist die Steigung im Power-Plot -1, was einer Proportionalität der Intensität zu h^{-1} entspricht. Diese Steigung ist typisch für steife, stäbchenförmige Partikel und entsteht durch den linearen Abfall der PDDF. Liegen jedoch flexible Zylinder vor, entspricht die Steigung -1,67 [26]. Informationen über den Querschnitt des Zylinders finden sich bei großen Winkeln. In diesem Bereich ändert sich die Steigung von -1 auf -4, wenn ein runder, homogener Querschnitt vorliegt.

Im Fall eines inhomogenen Querschnitts kommt es nicht zu einem stetigen Anstieg der PDDF bei kleinen Abständen. Die Erklärung ergibt sich aus der PDDF des Zylinderquerschnitts, die eine Oszillation hohe – niedrige – hohe Wahrscheinlichkeit aufweist (Abb. 2.4). Der lineare Verlauf der PDDF bei Ermittlung gemäß Kugelsymmetrie bleibt davon jedoch unbeeinflusst. Aufgrund der Oszillation über den Zylinderquerschnitt ergeben sich Änderungen bei großen Winkeln in der Streukurve. Bei kleinen Winkeln bleibt die Streufunktion jedoch unbeeinflusst.

2.2 Röntgenbeugung

Die Röntgenbeugung ist ein Spezialfall der Röntgenstreuung. Auch hier liegt eine Streuung von Röntgenstrahlen an Elektronen zugrunde. Aufgrund von Periodizitäten in der Struktur der vermessenen Probe kommt es jedoch zur Ausbildung charakteristischer Bragg-Reflexe. Derartige Periodizitäten werden z. B. von regelmäßigen Gitterabständen in kristallinen oder flüssigkristallinen Systemen gebildet. Die Position der entstehenden Reflexe ist über die Bragg'sche Beziehung mit dem Netzebenenabstand (d) verknüpft (n gibt die Ordnung des Reflexes an):

$$n\lambda = 2d \sin \vartheta \quad (2.8)$$

Auch in dieser Gleichung gilt der bei der Röntgenstreuung beschriebene reziproke Zusammenhang. Da kristalline Substanzen sehr kleine Netzebenenabstände aufweisen, werden sie mittels Röntgenweitwinkelbeugung (WAXD – $2\vartheta > 5^\circ$) untersucht. Flüssigkristalline Strukturen hingegen weisen eine Fernordnung auf und können dementsprechend mit Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXD – $2\vartheta < 5^\circ$) charakterisiert werden.

In der pharmazeutischen Industrie hat insbesondere WAXD eine sehr große Bedeutung, da mit dieser Methode unterschiedliche Kristallmodifikationen unterschieden werden können.

SAXD wird häufig für die Charakterisierung flüssigkristalliner Systeme eingesetzt. Die Reflexfolge im Streubild ist charakteristisch für die Art des vorliegenden Flüssigkristalls (z.B. lamellar, hexagonal, kubisch) [27]. Zusätzlich kann aus der Reflexposition auf die Größe des Netzebenenabstands geschlossen werden.

Kapitel 3

Oberflächenmodifizierte Lipidnanopartikel

3.1 Allgemeiner Teil

3.1.1 Entwicklung von festen Lipidnanopartikeln

In der Pharmazie werden bereits seit einigen Jahren kolloidale Formulierungen in Form von Emulsionen und Liposomen als Arzneistoffträger eingesetzt [28, 29]. Eine Alternative zu diesen Systemen, die Koaleszenz und Wirkstoffverlust durch Diffusion aus den Partikeln zeigen können, sind feste Nanopartikel [2, 3]. Ein großes Gewicht wurde in diesem Zusammenhang auf Polymere (z.B. Polymilchsäure/Polyglycolsäure, Polycyanoacrylate und Proteine) als Träger gelegt. Beispiele mikropartikulärer Formulierungen auf dem deutschen Markt sind Decapeptyl (Triptorelinacetat) und Sandostatatin (Octreotidacetat), die auf Polymilchsäure/glycolsäurepartikeln basieren.

Ein großes Problem beim Einsatz von Polymeren als Träger ist ihr zellschädigendes Potential. Gründe dafür können entweder die Polymere selbst sein, da sie als Nanopartikel von Macrophagen aufgenommen werden können [30, 31, 32], oder Rückstände aus dem Produktionsprozess [33]. Des Weiteren fehlen kosteneffiziente Methoden für die Produktion im Industriemaßstab unter Wahrung hoher Qualitätsstandards [3]. Im Vergleich bieten die später entwickelten festen Lipidnanopartikel (SLN - solid lipid nanoparticles) einige Vorteile. Es sind nanopartikuläre Systeme mit einer Partikelgröße von 50–1000 nm. Als Träger dienen bei Raumtemperatur feste Lipide, meistens Triacylglyceride, aber auch Wachse und Paraffine können eingesetzt werden [34, 35, 36]. Diese Stoffe weisen im Vergleich zu Polymeren eine wesentlich

geringere Toxizität auf [31, 32]. Zusätzlich gibt es mit der Hochdruckhomogenisation eine kosteneffiziente, etablierte Methode im Industriemaßstab [37].

SLN bieten die Möglichkeit der Adsorption oder Inkorporation von Arzneistoffen. Damit stellen sie eine mögliche Arzneiform für die verlängerte Wirkstofffreisetzung dar [4]. Zusätzlich ermöglicht die Inkorporation des Wirkstoffs einen Schutz vor chemischem Abbau [3, 4]. Die Einarbeitung von Wirkstoffen in die SLN ist mit vielen Wirkstoffen erfolgt (z.B.: Prednisolon, Retinol, Doxorubicin, Estradiol) [4, 34, 38, 39]. Die Beladungskapazität ist jedoch meist gering, da aufgrund des kristallinen Charakters der Partikel Fremdstoffe nur schlecht eingebaut werden können [5, 40].

Aufgrund dieses Nachteils wurden von Müller et al. 2002 Nanostructured Lipid Carriers (NLC) eingeführt. Bei den NLC wird die Kristallstruktur durch den Einbau chemisch unterschiedlicher Lipide gestört und damit die Beladungskapazität erhöht [41, 42]. Die vorgeschlagenen Strukturen und der Nutzen der NLCs sind jedoch umstritten [43, 44, 45].

Eine andere Möglichkeit, die Löslichkeit des Wirkstoffs in der Matrix und damit die Beladungskapazität der SLN zu erhöhen, wurde von Friedrich und Müller-Goymann beschrieben [6, 7]. Hier wurde Lecithin als amphiphiles Molekül in die Lipidmatrix eingearbeitet. Die resultierende Erhöhung der Wirkstofflöslichkeit in der Matrix wurde der Bildung einer festen invers mizellaren Lösung zugeschrieben, die die Wirkstoffe solubilisieren kann.

3.1.2 Eigenschaften von SLN und NLC

SLN bestehen aus einem kristallinen Lipidkern, der in der Regel eine Emulgatorhülle zur Stabilisierung aufweist. Der Wirkstoff wird entweder in den Kern inkorporiert oder an die Oberfläche adsorbiert.

Die Eigenschaften und die sich daraus ableitende Freisetzungsscharakteristik und Stabilität der SLN und NLC werden stark durch die folgenden Parameter beeinflusst:

- Partikelgröße und -form
- Oberflächenladung
- Kristallisationsgrad und polymorphe Form der Matrix
- Bildung weiterer Strukturen (Liposomen, Mizellen) durch die enthaltenen Emulgatoren

Sowohl die Partikelgröße als auch die -form haben einen großen Einfluss auf die Partikeloberfläche und üben damit einen direkten Einfluss auf die Wirkstofffreisetzung aus [46].

Ein wichtiger Aspekt ist die polymorphe Form der Matrix. Man unterscheidet zwischen β -, β' - und α -Form. Beim Abkühlvorgang bildet sich aus der Schmelze zunächst die α -Modifikation, die verhältnismäßig instabil ist. Bei Lagerung wird daraus die stabile β -Modifikation [47]. Diese Umlagerung erfolgt über eine metastabile β' -Modifikation, die über Jahre stabil sein kann. Der Ordnungsgrad der Kristalle nimmt in der Reihenfolge α , β' zu β zu [3, 48].

Aufgrund der während der Lagerung geringer werdenden Anzahl an Störstellen kommt es zur Erniedrigung der Beladungskapazität für Fremdstoffe. Dies kann eine Verdrängung des Wirkstoffs aus dem Kristallgitter zur Folge haben [5, 40]. Auch die Freisetzung der Wirkstoffe wird durch die polymorphe Form beeinflusst, denn ein größerer Ordnungsgrad bedeutet gleichzeitig eine Verringerung der Mobilität des Wirkstoffs in der Matrix [46].

Insbesondere kurzkettige, gesättigte Lipide neigen zur Bildung einer unterkühlten Schmelze [49]. Aufgrund der nicht erfolgten Kristallisation ist die Beladungskapazität sehr hoch, aber als Nanoemulsion weisen sie nicht die Vorteile von SLN auf [36, 50].

Das komplexe Kristallisationsverhalten der Lipide wird von vielen Faktoren wie eingesetztes Lipid, Größe der Partikel, Abkühlrate, verwendete Emulgatoren und Fremdstoffe beeinflusst [36, 51]. Eine schnellere Umlagerung wird zum Beispiel für kleinere Partikel beobachtet [52]. Auch die Art des Emulgators beeinflusst das Kristallisationsverhalten. So führt der Einsatz gesättigter Lecithine zur beschleunigten Kristallisation, aber langsameren Transformation von der α - in die β -Form als der Einsatz ungesättigter Phospholipide [50]. Schubert et al. haben nachgewiesen, dass eine Erhöhung der Lecithinkonzentration in einer schnelleren Umlagerung resultiert [10].

Für die Stabilisierung der SLN werden Emulgatoren eingesetzt. Diese befinden sich nicht ausschließlich an der Partikeloberfläche, sondern können zusätzlich Strukturen in Form von Mizellen und Liposomen bilden [36, 46]. So konnte die Existenz von Liposomen in Nanoemulsionen für die parenterale Ernährung nachgewiesen werden [53]. Auch für SLN-Formulierungen, die mit einer Phospholipid-Gallensalz-Mischung stabilisiert wurden, konnte cryo-mikroskopisch die Bildung von Liposomen nachgewiesen werden, wobei deren Anzahl geringer war als in Emulsionen [54]. Heiati et al. konnten hingegen mit Zentrifugationsuntersuchungen keine Liposomen nachweisen,

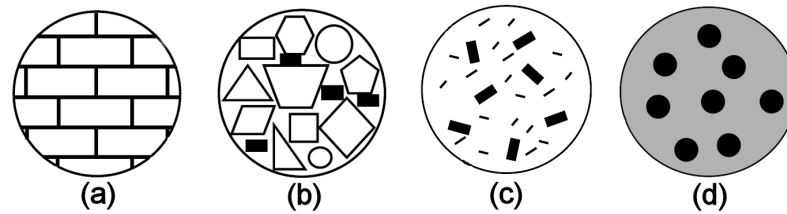


Abb. 3.1: Modelle von NLC (a) normale SLN (b) Kristall mit Defekten (c) Amorpher Typ (d) Multipler Typ (modifiziert nach [41]), die schwarzen Rechtecke bzw. Kreise stellen den Wirkstoff bzw. wirkstoffhaltige Tröpfchen dar.

woraus sie auf die Bildung multilamellarer Schichten um die Partikel schließen [55]. Diese zusätzlichen Strukturen können die Solubilisierung von Wirkstoff außerhalb der Partikel bewirken und damit die Wirkstofffreisetzung und die Beladungskapazität beeinflussen [36].

NLC hingegen sollen komplexer aufgebaut sein. Müller et al. schlagen die in Abbildung 3.1 dargestellten Modelle vor [41]. Die Kombination von festen und flüssigen – in geringer Konzentration – Lipiden führt demnach zur Bildung von Fehlstellen im Kristallgitter, in die der Wirkstoff eingearbeitet werden kann (Modell b) [56]. Wird die Konzentration des flüssigen Lipids erhöht, kann es nicht mehr molekulardispers gelöst werden, sondern bildet eine Art multiples System: Öl in festem Lipid in Wasser. In den Öltröpfchen kann der Wirkstoff besser gelöst werden (d) [42, 57]. Jores et al. beobachteten jedoch die Bildung von Nanospoons, bei denen Öltröpfchen auf festen Lipidpartikeln aufgelagert sind [43, 44, 45]. Die dritte Struktur von NLC ist der amorphe Typ. Auch hier werden geeignete feste und flüssige Lipide gemischt (z.B.: Hydroxyoctacosanylhydroxystearat und Isopropylmyristat). Es entstehen feste, aber amorphe Partikel, die eine höhere Beladungskapazität aufweisen (c) [56].

3.1.3 Herstellung von SLN

Mikroemulsionstechnik

Die Mikroemulsionstechnik wurde von Gasco eingeführt. Zunächst wird eine Mikroemulsion mit den geschmolzenen Lipiden hergestellt. Die heiße Mikroemulsion wird unter Rühren in eine kalte, wässrige Lösung gegeben [58]. Dies führt zur Präzipitation des geschmolzenen Lipids. Die entstehenden Partikel sind sehr klein, was nicht auf den mechanischen Effekt des Rührens, sondern den hohen Dispersitätsgrad der Lipide in der Mikroemulsion zurückzuführen ist [46].

Nachteil dieses Verfahrens ist ein geringer Lipidanteil und eine hohe Emulgatorkonzentration [36].

Emulsionstechnik

Verwendet wird eine wässrige Emulsion des Lipids, gelöst in mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmitteln. Diese wird zunächst hochdruckhomogenisiert. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt, wodurch es zur Präzipitation des Lipids kommt [59, 60]. Mit dieser Methode können je nach verwendetem Emulgator Partikelgrößen bis herab zu 25 nm erreicht werden und eine Einarbeitung thermolabiler Stoffe ist möglich. Als Nachteil muss jedoch die Verwendung organischer Lösemittel und die geringe Lipidkonzentration gewertet werden [36, 46].

Solvent-Injection

Lipid wird in einem mit Wasser in jedem Verhältnis mischbaren organischen Lösungsmittel gelöst und in eine gerührte wässrige Lösung gegeben. Durch die Verdünnung des Lösungsmittels kommt es zur Präzipitation des Lipids [61]. Auch bei dieser Methode ist der Einsatz von Lösungsmittel erforderlich, und es können nur geringe Mengen Lipid eingearbeitet werden. Im Vergleich zu den im Vorfeld beschriebenen Methoden kann die Emulgatorkonzentration jedoch verringert werden.

Superkritische Fluidextraktion von Emulsionen

Das Patent beschreibt die Herstellung von 5–1000 nm großen Partikeln aus einer O/W-Emulsion mit dem in organischen Lösungsmitteln gelösten Lipid. Das verwendete Lösungsmittel muss vollständig im eingesetzten superkritischen Fluid (SCF) löslich sein. Bei Zugabe des SCF diffundiert das Lösungsmittel in das SCF, das Lipid fällt aus [62]. Derzeit gibt es noch keine weiteren Untersuchungen zu dieser Herstellungsmethode, so dass eine Beurteilung erst später erfolgen kann.

Rotor-Stator-Homogenisation und Ultraschallhomogenisation

Diese Methode kommt ohne organische Lösungsmittel aus. Die Lipide werden aufgeschmolzen und mit Hilfe eines Rotor-Stator Homogenisators oder Ultraschall in der heißen, wässrigen Phase dispergiert. Dabei werden breite Partikelgrößenverteilungen zwischen 100 und 200 nm erreicht [36, 46].

Hochdruckhomogenisation

Die Hochdruckhomogenisation ist derzeit die Standardmethode zur Herstellung von SLN, insbesondere da Scaling-Up hier meist kein Problem darstellt [37]. Bei dieser Methode wird Flüssigkeit mit hohem Druck (100–2000 bar) durch einen schmalen Spalt gepresst (einige Mikrometer). Dadurch wird die Flüssigkeit innerhalb kürzester Zeit auf sehr hohe Geschwindigkeiten (über 1000 km/h) beschleunigt. Die Folge sind

sehr hohe Scherkräfte und Kavitation, die die Partikel bis in den Nanometerbereich zerkleinern [46]. Der max. Lipidgehalt der SLN liegt bei ca. 30 % [48].

Man unterscheidet zwei Varianten: Heiß- und Kalthomogenisation. Bei der Heißhomogenisation wird das Lipid zunächst geschmolzen und zusammen mit der heißen, wässrigen Phase z.B. mittels Ultra-Turrax vordispersiert und anschließend bei Temperaturen über dem Schmelzpunkt des Lipids homogenisiert. Durch die Erstarrung des Lipids beim Abkühlen entsteht die Nanosuspension. Bei der Kalthomogenisation wird die Lipidmatrix im Vorfeld in flüssigem Stickstoff oder Trockeneis gemahlen. Diese vorzerkleinerten Partikel (50–100 μm) werden in die kalte, wässrige Phase gegeben und anschließend bei Raumtemperatur oder kälter homogenisiert. Um ein Aufschmelzen des Lipids während der Homogenisation zu verhindern, ist eine exakte Temperaturführung wichtig. Zwar sind die Partikelgrößenverteilungen bei der Kalthomogenisation in der Regel größer und breiter, dennoch bietet sie zur Heißhomogenisation einige Vorteile [3, 46]:

- geringere Temperaturbelastung für den Wirkstoff während der Homogenisation
- Die Verteilung insbesondere hydrophiler Wirkstoffe in die wässrige Phase wird verringert
- durch das schnelle, tiefe Abkühlen der Matrix ist der Rekristallisationsschritt weniger komplex

3.2 Material und Methoden

Die in diesem Teil der Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Martin Schubert an der von ihm entwickelten Formulierung erhalten, wobei die TEM-Aufnahmen von Herrn Schubert zur Verfügung gestellt wurden.

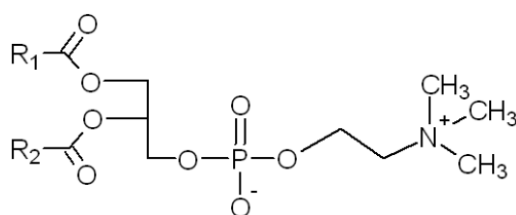
3.2.1 Material

Hartfett

Als Lipidmatrix wurde Hartfett in Form von Softisan 154 (S154) (Condea, Deutschland, Witten) verwendet, das freundlicherweise vom Hersteller zur Verfügung gestellt wurde. S154 ist ein Gemisch gesättigter Triglyceride, die partialsynthetisch

Tab. 3.1: Zusammensetzung der Fettsäurereste (links) und die Fettkennzahlen (rechts) von S154

Fettsäure	Anteil [%]	Kennzahl	Wert
Laurinsäure C _{12:0}	< 2	Steigschmelzpunkt	56,7 °C
Myristinsäure C _{14:0}	< 3	Verseifungszahl	200 mg KOH / g
Palmitinsäure C _{16:0}	48	Iodzahl	< 3 mg I / 100mg
Stearinsäure C _{18:0}	48	Säurezahl	0,14 mg KOH / g
		Hydroxylzahl	5,5 mg KOH / g



Fettsäure	Anteil [%]
Palmitinsäure C _{16:0}	12,9
Stearinsäure C _{18:0}	4,4
Ölsäure C _{18:1}	10,5
Linolsäure C _{18:2}	66,5
Linolensäure C _{18:3}	5,7

Abb. 3.2: Strukturformel von Phosphatidylcholin und die Anteile der Fettsäurereste (R₁ und R₂)

aus Palmkernöl gewonnen werden. Die Zusammensetzung der Fettsäurereste [63] sowie die Fettkennzahlen (laut Analysenzertifikat) gibt Tabelle 3.1 wieder.

Phosphatidylcholin

Phosphatidylcholin ist ein amphiphiles Molekül, bei dem ein Cholinrest über Phosphat mit Glycerin und zwei Fettsäuren verbunden ist. Durch den voluminösen lipophilen Rest weist es einen Packungsparameter größer als 1 auf. Es werden also bevorzugt lamellare Mesophasen und liposomale Assoziate ausgebildet.

Das eingesetzte Phospholipid war Phospholipon 90 G (P90G), das freundlicherweise vom Hersteller (Nattermann Phospholipid GmbH, Deutschland, Köln) zur Verfügung gestellt wurde. Es handelt sich um ein hoch gereinigtes Sojalecithin, das laut Analysenzertifikat einen Phosphatidylcholingehalt von 90 - 96 % aufweist. Der maximale Anteil an Lysophosphatidylcholin beträgt 6,0 %.

Der Aufbau von Phosphatidylcholin und die Zusammensetzung der Fettsäurereste ist in Abbildung 3.2 dargestellt [64].

Im Folgenden wird anstelle von Phosphatidylcholin Lecithin geschrieben.

Macrogol-15-hydroxystearat

Als hydrophiler Emulgator wurde Solutol HS15 (SOL) (BASF, Deutschland, Ludwigshafen) eingesetzt. SOL ist Macrogol-15-hydroxystearat, ein nicht-ionischer Emulgator mit einem HLB-Wert von 14-16, der aufgrund seiner geringen Toxizität als Lösungsvermittler für Parenteralia verwendet werden kann [65].

Im Folgenden wird die Bezeichnung Solutol oder die Abkürzung SOL verwendet.

Thiomersal

Zur Konservierung wurde Thiomersal (Caelo, Deutschland, Hilden) in einer Konzentration von 0,005 % (m/m) bezogen auf die Wasserphase verwendet.

Wasser

Es wurde ausschließlich frisch hergestelltes, bidestilliertes Wasser eingesetzt.

3.2.2 Methoden**3.2.2.1 Herstellung der Systeme****Lipidmatrix (LM)**

S154 und P90G (0-50 % m/m) wurden eingewogen und anschließend unter Rühren aufgeschmolzen, bis eine klare, gelbe Lösung entstand. Diese wurde bis zum Erstarren kaltgerührt.

Lipidnanopartikelsuspension (SLN)

Die Herstellung erfolgte mittels Heißhomogenisation. Zunächst wurde eine Lösung von 1 % (für SLN mit 5 % LM) oder 3 % (m/m) SOL (für SLN mit 15 % LM) und 0,005 % (m/m) Thiomersal in Wasser hergestellt (bezogen auf die Wasserphase). Zu dieser Lösung wurde die Lipidmatrix gegeben (5 oder 15 % (m/m) bezogen auf das Gesamtsystem). Die erhaltene Dispersion wurde bei 70 °C mit einem Ultra Turrax (IKA, Deutschland, Stauffen) bei 13000 Upm für 5 min vordispersiert. Die Homogenisation der Voremulsion erfolgte mit einem Emulsi-Flex-C5 (Avestin, Kanada, Ottawa) bei 1000 bar über 20 Zyklen bei 50 °C. Anschließend erfolgte die Rekristallisation der Partikel bei Raumtemperatur.

SAXS-Referenzsysteme

Die Systeme bestanden aus 1,0 % (m/m) SOL und einem variierendem Anteil (0-

2,5 % (m/m)) P90G in Wasser. Die Bestandteile wurden eingewogen und anschließend mittels Ultraschall (SoniPrep 150, MSE Scientific Instruments, England, Crawley) dispergiert. Die Beschallung erfolgte in 30 Zyklen über 30 s Beschallen und 30 s Pause.

NMR-Referenzsysteme

Die folgenden Referenzsysteme wurden in Wasser hergestellt: mizellare Lösung (3,0 % (m/m) SOL), kleine, unilamellare Liposomen (4,5 % (m/m) P90G) und eine gemischte Dispersion (3,0 % (m/m) SOL und 4,5 % P90G). Die Dispergierung erfolgte entsprechend den SAXS-Referenzsystemen.

Zusätzlich wurde eine ethanolische P90G-Lösung hergestellt (4,5 % (m/m) P90G).

3.2.2.2 Röntgenkleinwinkelbeugung (SAXD)

Die Messungen erfolgten mit einer Kratky-Kompaktkamera bei ca. 10^{-4} bar. Die Proben wurden mittels der Temperiereinheit K-Pr temperiert (beide: Anton Paar, Österreich, Graz). Die eingesetzte Röntgenstrahlung war Cu-K α -Strahlung mit einer Wellenlänge von $\lambda=0,1542$ nm, die vom Generator PW1830 mit der Röhre PW2253/11 (beide: Philips, Deutschland, Kassel) bei einer Spannung von 30 kV und einer Stromstärke von 20 mA produziert wurde. Die ebenfalls vorhandene K β -Strahlung wurde durch einen Nickelfilter vor dem Kollimationssystem reduziert. Die Detektion erfolgte mittels ortsempfindlichem Detektor (OED 50M, MBraun, Deutschland, München). Die Messzeit wurde um die Totzeit des Detektors korrigiert.

Für die Entschmierung der Beugungskurven wurde das Programmpaket ITR-92 (Anton Paar, Österreich, Graz) eingesetzt. Die Entschmierung beruht auf dem System der indirekten Transformation im reziproken Raum (ITR) [66]. Nach erfolgter Entschmierung kann der Netzebenenabstand d über die Bragg'sche Gleichung ($n\lambda = 2d \sin \vartheta$ mit $h = (4\pi/\lambda) \sin \vartheta$) errechnet werden.

Matrix

Die Matrix wurde als Pulver zwischen zwei Kaptonfolien (Kapton H25, DuPont, USA, Willmington) vermessen. Die Proben wurden vor der Messung für 10 min bei 20 °C temperiert und anschließend 600 s vermessen.

Aufgrund des Aufbaus des Probenhalters war es nicht möglich, einheitliche Mengen an Pulver in den Strahlengang einzubringen, so dass die Ergebnisse lediglich qualitativ auswertbar sind.

Lipidnanopartikelsuspension

Vor der Messung wurden die Proben mit einem Lipidanteil von 5 % für 10 min bei 20 °C temperiert. Die Messzeit betrug 3600 s.

3.2.2.3 Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)

Um die Nanopartikel (5 und 15 % Lipidanteil) zu entfernen, wurden die Nanosuspensionen vor der SAXS-Messung bei 3000 g durch einen Vivaspin 20 ml Konzentrator (Vivascience, Deutschland, Hannover) für 30 min zentrifugiert (Allegra 64R Centrifuge, Beckman Coulter, USA, Fullerton). Die SAXS-Referenzsysteme wurden sowohl vor als auch nach der Zentrifugation vermessen.

Der Messaufbau entsprach den SAXD-Messungen. Vor der Messung wurden die Proben für 10 min bei 20 °C temperiert. Die Messzeit betrug 3600 s. Für die Entschmierung der Streukurven wurde das Programmpaket ITP-92 (Anton Paar, Österreich, Graz) eingesetzt. Die Entschmierung und die Berechnung der Elektronenabstandsfunktion (PDDF) erfolgte mittels inverser Fouriertransformation (ITP) nach Glatter [25].

3.2.2.4 Partikelgrößenbestimmung

Laserlichtbeugung

Die Laserlichtbeugung wurde zur Bestimmung von Partikelgrößen über 1000 nm eingesetzt. Durchgeführt wurde sie mit einem Mastersizer MS 20 (Malvern, Deutschland, Herrenberg). Vor der Messung wurden ca. 50 mg der Lipidnanopartikeldispersion in 100 ml Wasser verdünnt. Die erhaltene Partikelgröße ist der Median der Volumenverteilung, und wurde von der Software Malvern SB O9 unter Anwendung der Fraunhofer-Theorie berechnet.

Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Bei Partikelgrößen unter 1000 nm wurde die PCS eingesetzt. Durchgeführt wurden die Messungen mit dem Zetasizer 3 (Malvern, Deutschland, Herrenberg), modifiziert mit einem He/Ne-Laser (SpectraPhysics, USA, Mt. View) bei einem Winkel von 90°. Um Mehrfachstreuung zu vermeiden, wurden die Lipidnanopartikel vor der Messung mit filtriertem, bidestilliertem Wasser verdünnt. Als Probenzelle dienten Pyrokontrol-Röhrchen (10 x 75 mm, Acila, Deutschland, Walldorf). Die Proben wurden bei 20 °C für 2 min mit einer Messzeit von 30 ms vermessen. Jede Messung

wurde mindestens dreimal durchgeführt. Für die Auswertung wurde der *zAverage* (zAv) und der Polydispersitätsindex (PI) verwendet.

3.2.2.5 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die Proben (Lipidmatrix bzw. SLN mit 5% Lipidmatrix) wurden in schmelzendem Stickstoff bei -210°C zwischen zwei Goldplättchen schockgefroren. Die so erhaltene Probe wurde in einer Gefrierbruchätzanlage BAF 400 (Balzers, Deutschland, Wiesbaden) bei -100°C und $5 \cdot 10^{-6}$ bar zunächst gebrochen und danach mit Platin-Kohle im Winkel von 45° bedampft. Im Anschluss erfolgte eine Bedampfung mit reiner Kohle im Winkel von 90° . Die so erhaltenen Replika wurden mit konzentrierter Schwefelsäure und Wasser von den Probenresten gereinigt und mit dem Transmissionselektronenmikroskop EM 300 (Philips, Deutschland, Kassel) bei 80 kV untersucht.

3.2.2.6 NMR-Spektroskopie

Zur Erhöhung der Empfindlichkeit wurden Lipidnanopartikelsuspensionen mit einem Lipidanteil von 15 % untersucht. Die Messungen wurden mit einem NMR-Spektrometer DRX-400 (Bruker, Deutschland, Rheinstätten) bei 400 MHz und 20°C durchgeführt. Als Locksubstanz wurde für ^1H -NMR -Messungen D_2O in einer Kapillare mit in das NMR-Probengefäß gegeben. Bei den ^{31}P -NMR-Untersuchungen diente Orthophosphorsäure als externer Standard.

3.2.2.7 IR-Spektroskopie

Für die Untersuchungen wurde ein Kaliumbromid-Pressling mit der Probe hergestellt. Dieser wurde im Anschluss mit dem IR200 (ThermoNicolet, USA, Waltham) im Wellenlängenbereich von $400 - 4000\text{ cm}^{-1}$ vermessen.

Als Probe dienten die gefriergetrockneten Lipidnanopartikel, die unbehandelte Lipidmatrix sowie die Substanzen P90G (gefriergetrocknete Liposomen), S154 und SOL (gefriergetrocknete mizellare Lösung). Auf eine Untersuchung des Thiomersals wurde aufgrund der geringen Konzentration im Gesamtsystem (0,005% in der Wasserphase) verzichtet.

3.3 Versuchsergebnisse und Diskussion

Wie bereits im Abschnitt 2.1 beschrieben, stellt die geringe Beladungskapazität von festen Lipidnanopartikeln ein großes Problem dar. In vorangegangenen Arbeiten dieser Gruppe wurde untersucht, ob eine Matrix aus Triglyceriden zusammen mit Phospholipid eine Erhöhung der Beladungskapazität auch in dispergierter Form bewirkt [6, 7].

In diesem Teil der Arbeit wird untersucht, wie das Phospholipid in die Formulierung eingebaut ist. Da die Matrix während der Herstellung aufgeschmolzen wird, entsteht intermediär eine Emulsion. Daraus kann man die möglichen Aufenthaltsorte des Lecithins nach der Herstellung ableiten:

- Das Phospholipid verbleibt in der Matrix und wird mit in das Triglycerid-Kristallgitter eingebaut und/oder bildet eine feste invers mizellare Lösung [6].
- Nach dem Aufschmelzen der Matrix diffundiert das Lecithin in die Grenzfläche der Emulsion, um diese zu stabilisieren. Dort bilden sie einen Monolayer und/oder multilamellare Schichten um den Tropfen.
- Lecithin kann aus den lipophilen Tropfen in das wässrige Umgebungsmedium diffundieren und dort kolloidale Mischstrukturen wie Liposomen und Mizellen mit dem ebenfalls enthaltenen Emulgator Solutol HS15 eingehen.

Des Weiteren kann mit den angewendeten Methoden eine Information über die polymorphe Form des Hartfetts gewonnen werden.

3.3.1 Partikelgröße

Variation des Lecithingehalts

Die Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS) wurde eingesetzt, um den hydrodynamischen Durchmesser (*zAverage*) der dispergierten Partikel zu ermitteln, der ein Maß für die Größe der Partikel darstellt. Ein weiterer resultierender Parameter ist der Polydispersitätsindex (PI), der einen Wert von 0 bis 1 aufweist und ein Maß für die Polydispersität einer Formulierung ist.

In Tabelle 3.2 sind die Ergebnisse der Partikelgrößenbestimmung dargestellt. Das System mit 15 % Lipidmatrix und 10 % Lecithin wurde nicht mittels PCS vermessen, sondern es wurde auf die Laserlichtbeugung zurückgegriffen, da hier Partikelgrößen

Tab. 3.2: Partikelgrößen der Lipidnanopartikel mit unterschiedlichem Gehalt an Lecithin in der Matrix (10-50%) und variierendem Lipidanteil (5% und 15%) (n=3) (10 % P90G und 15 % Matrix wurde mittels Laserlichtbeugung bestimmt)

Gehalt	5% Lipidmatrix		15% Lipidmatrix	
P90G	zAv±sd [nm]	PI ± sd	zAv±sd [nm]	PI ± sd
10%	278 ± 7	0,27 ± 0,02	12200 ± 650	—
20%	165 ± 3	0,20 ± 0,01	158 ± 3	0,20 ± 0,01
30%	100 ± 4	0,19 ± 0,01	104 ± 2	0,22 ± 0,01
40%	97 ± 3	0,18 ± 0,01	104 ± 5	0,20 ± 0,01
50%	98 ± 5	0,20 ± 0,01	103 ± 3	0,20 ± 0,02

im Mikrometerbereich vorliegen. Als Ergebnis ist der Median der Volumenverteilung angegeben.

Alle Systeme mit einem geringen Anteil an Lipidmatrix (5 %) und einem Lecithin-Gehalt von 10-50 % bezogen auf die Lipidmatrix ließen sich ohne Probleme herstellen. Die Partikelgrößen werden mit zunehmendem Anteil an Lecithin (bis 30 %) kleiner, was auf eine Stabilisierung der Grenzfläche durch Lecithin schließen lässt. Da bei der Heißhomogenisation eine Emulsion dispergiert wird, kann P90G aus dem Inneren der Tröpfchen in die Grenzfläche diffundieren und dort zur Stabilisierung beitragen. Je mehr Lecithin vorliegt, desto kleinere Emulsionströpfchen können stabilisiert werden. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit vorangegangenen Arbeiten dieser Gruppe [9, 11].

Ab einem kritischen Lecithingehalt von 30 % bleibt die Partikelgröße konstant. Überschüssiges Lecithin wird also nicht mehr für eine Vergrößerung der Grenzflächen verwendet, sondern kann zusätzliche Lamellen um die Partikel bilden, in die wässrige Phase diffundieren oder in die Matrix inkorporiert werden. Auch dies wurde bereits vorher beschrieben [9, 11].

Wird der Gehalt an Lipidmatrix im Gesamtsystem von 5 auf 15 % erhöht, ändern sich die resultierenden Partikelgrößen nicht. Die Struktur der Nanopartikel bleibt durch eine Erhöhung des Matrixanteils von 5 auf 15 % wahrscheinlich unverändert. Der einzige Unterschied ist bei 15 % Lipidmatrix mit 10 % P90G zu erkennen. Die Partikelgröße ist um ein Vielfaches größer und diese Formulierung nimmt nach einiger Zeit eine halbfeste, redispersierbare Form ein. Dies wurde ebenfalls bereits in früheren Arbeiten gezeigt [10, 11]. Die Bildung halbfester Systeme wird häufig bei SLN beobachtet, die mit Phospholipid stabilisiert sind, und wird mit einer ungenügenden Emulgatorkonzentration in der Grenzfläche begründet [36].

Tab. 3.3: Partikelgrößen von SLN mit 5% Lipidmatrix (30% P90G) und unterschiedlichem Solutolgehalt (n=3).

Gehalt Solutol [%]	zAv±sd	PI ± sd
1,00	97 ± 1	0,18 ± 0,01
1,67	69 ± 2	0,19 ± 0,01
2,50	56 ± 1	0,16 ± 0,00

Variation des Solutolgehalts

Tabelle 3.3 zeigt, dass eine Erhöhung des Solutolanteils in einer weiteren Partikelgrößenverkleinerung resultiert, was auch in vorangegangenen Arbeiten beobachtet wurde [9, 10]. Dies kann über den kleineren Packungsparameter des Solutols im Vergleich zum Lecithin erklärt werden. Während Lecithin aufgrund des kleineren hydrophilen Restes keine kleineren Tröpfchen mehr stabilisieren kann, ist dies mit Solutol möglich.

Es wäre interessant gewesen, diesen Aspekt an den Systemen mit 15 % LM ebenfalls zu untersuchen, da diese bei einem geringen Anteil an P90G große Partikel im Mikrometerbereich bilden. Dies ist im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht erfolgt, da der Fokus auf den Systemen mit 5 % LM lag.

3.3.2 TEM

Matrix

Abbildung 3.3 ist stellvertretend für alle Lipidmatrixformulierungen. Triglyceride kristallisieren in lamellaren Strukturen aus, was an den treppenartigen Strukturen deutlich zu erkennen ist [47]. Es kann kein Unterschied in den Systemen mit variierendem Lecithingehalt beobachtet werden.

Friedrich und Müller-Goymann beobachteten Bereiche mit 10 - 20 nm großen, kugelförmigen Aggregaten, die sie als feste invers mizellare Lösung interpretieren [6]. In den vorliegenden Systemen konnten sie nicht beobachtet werden.

Da Lecithin ebenfalls lamellare Strukturen ähnlicher Größenordnung aufweist, kann mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden, ob Triglycerid und Lecithin getrennt kristallisieren oder ob es sich um Mischkristalle handelt.

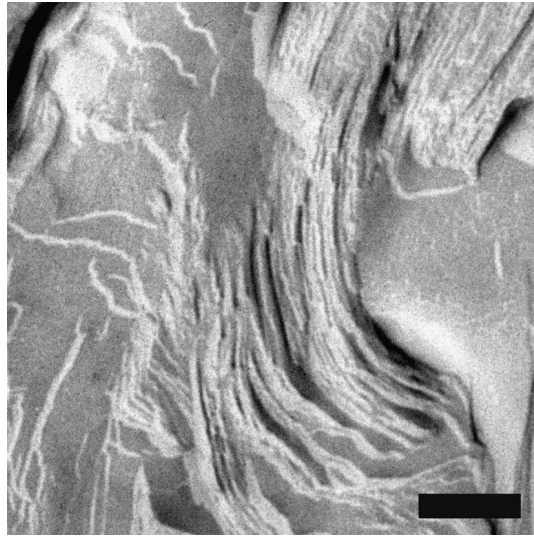


Abb. 3.3: TEM-Aufnahme einer Lipidmatrix mit 50% P90G (Balken: 200 nm).

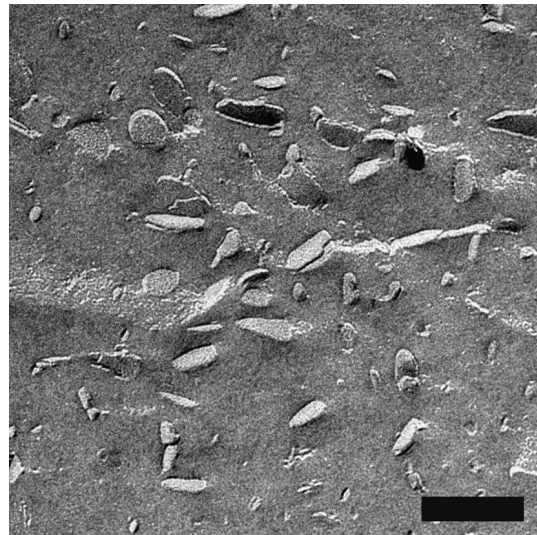
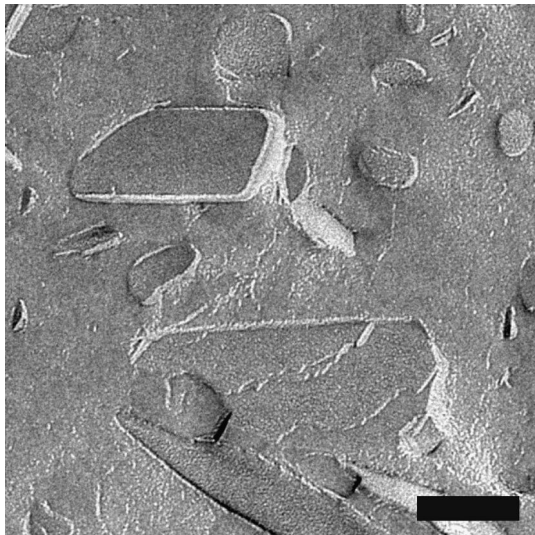


Abb. 3.4: TEM-Aufnahmen von Lipidnanopartikelformulierungen mit 5% Lipidmatrix (links: 10 % P90G rechts: 50 % P90G, Balken: 200 nm).

Feste Lipidnanopartikel

Abbildung 3.4 zeigt TEM-Aufnahmen von Lipidnanopartikeln. Die Partikel haben eine plättchenartige Struktur, die ebenfalls auf ein lamellares Kristallgitter der Triglyceride schließen lässt. Die Dicke der Plättchen liegt bei ca. 20 nm. Analog den Partikelgrößenbestimmungen ist zu erkennen, dass die Größe der Partikel mit zunehmendem Gehalt an P90G kleiner wird.

Sollten sich um die Partikel Lamellen aus Lecithin gebildet haben, sind diese mit dieser Methode nicht nachweisbar, da es sich auch um lamellare Strukturen ähnlicher

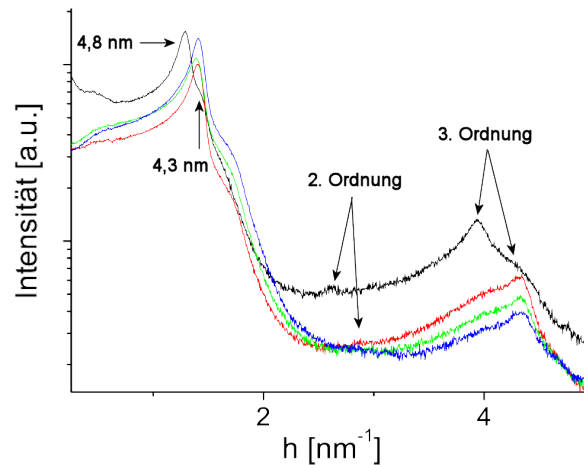


Abb. 3.5: verschmierte SAXD-Messungen der Lipidmatrices mit unterschiedlichem Gehalt an Lecithin 28 Tage nach dem Aufschmelzen (schwarz: 0 %, rot 10 %, grün 30 %, blau 50 % P90G)

Größenordnung handelt. Nachweisbar hingegen sind eventuell vorliegende liposomale Strukturen in der wässrigen Phase, die als kugelförmige, lamellare Aggregate vorliegen. Liposomale oder mischmizellare Strukturen konnten nicht beobachtet werden.

3.3.3 SAXD

Mit Hilfe der Röntgenkleinwinkelbeugung können Fernordnungen in Kristallen und Flüssigkristallen nachgewiesen werden. Die unterschiedlichen polymorphen Formen des Hartfetts weisen eine solche Fernordnung auf (s. 3.3.2). Durch den unterschiedlichen Aufbau ist der Netzebenenabstand der α -Modifikation größer als der der β - und β' -Form. Während in der α -Modifikation die Moleküle senkrecht zueinander stehen, stehen sie in der β - und β' -Modifikation schräg aufeinander, was in einem kleineren Abstand resultiert [47].

Matrix

Abbildung 3.5 zeigt die Daten der Röntgenkleinwinkelbeugung 28 Tage nach dem Aufschmelzen und Wiedererstarren. Eine Fernordnung in Form von Bragg-Reflexen ist deutlich zu erkennen. Deutlich zu sehen ist das erste und dritte Signal der lamellaren Triglycerid-Struktur. Das Signal zweiter Ordnung kann nicht bzw. teilweise schwach nachgewiesen werden. Des Weiteren wird ein breites Signal bei ca. $4,1 \text{ nm}^{-1}$ detektiert, das nicht zur Probe gehört, sondern durch die für die Messung verwendete Kaptonfolie hervorgerufen wird.

Tab. 3.4: Netzebenenabstände [nm] der Lipidmatrix (LM) und der Lipidnanopartikel (SLN) nach 1 und 28 Tagen Lagerung.

Zeit		Gehalt P90G [%]					
	[d]	0	10	20	30	40	50
LM	1	4,8	4,2	4,3	4,3	4,3	4,3
LM	28	4,8	4,3	4,3	4,4	4,3	4,3
SLN	1	—	4,2	4,3	4,3	4,3	4,3
SLN	28	—	4,2	4,3	4,2	4,3	4,4

Tabelle 3.4 zeigt die Netzebenenabstände, die sich aus den Beugungskurven nach der Entschmierung ergeben. Man kann deutlich erkennen, dass ein Zusatz von Lecithin eine Verringerung des Netzebenenabstands von 4,8 nm auf ca. 4,3 nm bewirkt. Dies weist darauf hin, dass Lecithin eine Kristallisation in der β - oder β' -Modifikation bewirkt, während bei Abwesenheit von Lecithin eine Kristallisation in der α -Modifikation erfolgt. Der Netzebenenabstand des unbehandelten Softisans entspricht mit 4,3 nm dem der β - oder β' -Modifikation. Dies bestätigt vorherige Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe, wobei nachgewiesen wurde, dass unbehandeltes S154 in der β' - und nach dem Aufschmelzen in der α -Modifikation vorliegt. Die α -Modifikation blieb dabei über die Lagerung stabil. Im Gegensatz dazu kommt es bei der Rekristallisation des Hartfetts in Gegenwart von min. 10 % Lecithin in der Matrix zu einer Umlagerung der α -in die β' - und β -Modifikation [10, 67].

Die Flächen unter den Reflexen können eine Aussage über den kristallinen Anteil des Hartfetts machen. Im Fall des für die Messung der Lipidmatrices verwendeten Probenhalters ist jedoch nicht immer die gleiche Substanzmenge im Strahl, so dass die Intensitäten nicht miteinander verglichen werden können.

Feste Lipidnanopartikel

Die Netzebenenabstände, die sich für die Kristallstruktur des Hartfetts in den Nanopartikeln ergeben haben, sind in Tabelle 3.4 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass S154 in der β - oder β' -Modifikation auskristallisiert. Auch dies entspricht früheren Ergebnissen [10, 67].

Hier konnte die Formulierung in einer Kapillare vermessen werden, so dass in diesem Fall ein Vergleich der Flächen miteinander eine Aussage über die Kristallinität zulässt. Schubert et al. beschreiben, dass mit zunehmenden Gehalt an Lecithin in

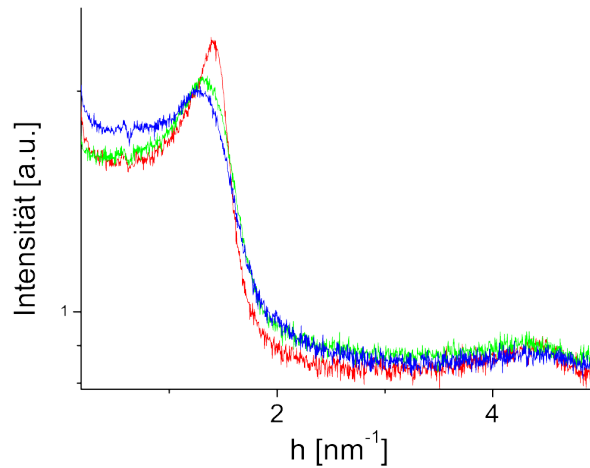


Abb. 3.6: SAXD-Daten der Lipidnanopartikel mit unterschiedlichem Gehalt an Lecithin, 28 Tage nach der Herstellung (rot: 10 %, grün 30 %, blau 50 % P90G).

Tab. 3.5: Netzebenenabstände der Lipidnanopartikel (SLN) [nm] nach 1 und 28 Tagen Lagerung.

		Gehalt SOL [%]		
	Zeit [d]	1,00	1,67	2,50
SLN	1	4,3	4,3	4,4
SLN	28	4,2	4,3	4,3

der Matrix, der Kristallinitätsgrad abnimmt [10], was mit Hilfe der Beugungsdaten, wie sie in Abbildung 3.6 dargestellt sind, bestätigt werden kann.

Variation des Solutolgehalts

Wird in der Lipidnanopartikelformulierung der Gehalt an Solutol erhöht (1,0 %, 1,67 % und 2,5 % SOL in der Wasserphase), bleibt der Netzebenenabstand des Hartfetts unverändert (Tabelle 3.5). Ein analoges Verhalten wurde in vorangegangenen Arbeiten mit Hilfe von Weitwinkelbeugungsuntersuchungen beobachtet [10].

3.3.4 SAXS

Die wässrige Phase der nanopartikulären Formulierungen wurde mittels Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) untersucht. Mit dieser Methode können mizellare und liposomale Aggregate nachgewiesen werden.

Da die festen Lipidnanopartikel, wie bereits in Abschnitt 3.3.3 gezeigt, einen lamellaren Aufbau aufweisen, wurden sie vor der Untersuchung durch Zentrifugation

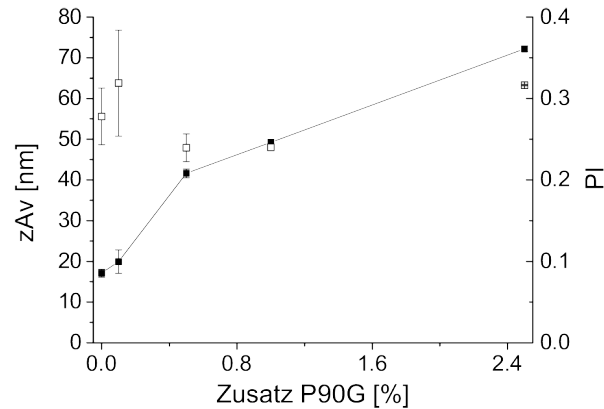


Abb. 3.7: Charakterisierung der SAXS-Referenzsysteme - Partikelgrößen bestimmt mit PCS (zAv (gefüllte Quadrate) und PI (offene Quadrate); SOL=1,0 %; n=3)

entfernt. Dabei muss die Formulierung einen Filter passieren, der die Partikel zurückhält. Das Filtrat wurde im Anschluss auf das Vorliegen kolloidaler Aggregate untersucht.

SAXS-Referenzsysteme

Entsprechend der Zusammensetzung der Formulierung kann die wässrige Phase Solutol und Lecithin – das aus der Lipidmatrix in die wässrige Phase diffundiert – enthalten, wodurch mischmizellare oder liposomale Strukturen gebildet werden können. Während Solutol in Wasser Mizellen bildet [65], bevorzugt Lecithin die Bildung von Liposomen. Um festzustellen, welchen Aufbau die möglicherweise gebildeten Assoziate aus Mischungen von SOL und P90G aufweisen, wurden Referenzsysteme hergestellt. Da die Konzentration an Lecithin in der wässrigen Phase unbekannt ist, wurde diese variiert, bis zum maximal möglichen Anteil von 2,5 %. Dies entspricht der Menge an Lecithin im Gesamtsystem bei 5 % Lipidmatrix mit 50 % P90G. Da Solutol ein sehr hydrophiler Emulgator ist, wurde davon ausgegangen, dass er sich quantitativ in der wässrigen Phase befindet. Dementsprechend wurde die Konzentration mit 1,0 % konstant gehalten. Zur Strukturuntersuchung der Referenzsysteme wurde PCS zur Partikelgrößenanalyse und SAXS zur Untersuchung des Aufbaus der entstandenen Kolloide herangezogen. Eine Übersicht über die Ergebnisse ist in Abbildung 3.7 und Tabelle 3.6 dargestellt.

Die PCS-Daten (Abbildung 3.7) zeigen, dass ein Zusatz von Lecithin zu den Solutol-Assoziaten eine Vergrößerung der Partikel von 17 nm auf 72 nm bewirkt. Dabei kommt es zwischen 0,1 % und 0,5 % P90G zu einem Sprung im Partikelwachstum. Dieses Verhalten ist mit einer Änderung des Packungsparameters zu begründen. Der Packungsparameter beschreibt das Verhältnis des lipophilen zum hydrophilen

Tab. 3.6: Charakterisierung der SAXS-Referenzsysteme - Ergebnisse der Strukturuntersuchung mittels SAXS (Konzentration von Solutol = 1,0 %)

P90G [%]	Aufbau	Größe [nm]	Dicke Hülle [nm]
0,0	Mizellar	12, 3	—
0,1	Mizellar	13, 3	—
0,5	Liposomal	—	7, 9
1,0	Liposomal	—	6, 9
2,5	Liposomal	—	4, 4

Volumen eines Emulgators [68, 69, 70]. Lecithin weist einen Packungsparameter nahe 1 auf und bevorzugt damit planare Systeme wie z.B. in Liposomen. Im Gegensatz dazu hat Solutol HS15 – aufgrund des großen hydrophilen Restes im Vergleich zum lipophilen Teil – einen verhältnismäßig kleinen Packungsparameter und bevorzugt die Bildung kugelförmiger Mizellen. Der Zusatz geringer Mengen Lecithin führt zu dessen Solubilisierung in den Solutol-Mizellen. Größere Mengen an Lecithin führen zur Bildung von Liposomen, in welche Solutol eingebaut ist. Je größer der Anteil an Lecithin, desto weniger kann der begrenzende Bilayer gekrümmt werden - die Liposomen werden größer. Analog verhält es sich mit der Größe der SOL-Mizellen bei der Solubilisierung von P90G.

Die PCS-Ergebnisse werden durch die Ergebnisse der Röntgenkleinwinkelstreuung (Tabelle 3.6) bestätigt. Mit Hilfe dieser Methode kann zusätzlich die Form der Aggregate ermittelt werden. Die gemessenen Streukurven wurden einer inversen Fouriertransformation unterworfen. Das Ergebnis ist eine Elektronenabstandsfunktion (PDDF), die die Wahrscheinlichkeit ($p(r)$) angibt, zwei Elektronen im Abstand r voneinander zu finden. Abbildung 3.8 zeigt beispielhaft die PDDF der reinen Solutol-Mizellen. Man kann eine Oszillation hohe - niedrige - hohe Wahrscheinlichkeit erkennen. Dies deutet auf das Vorliegen inhomogener Mizellen hin, wobei der dritte Nulldurchgang der Größe der Mizelle entspricht. Der nahezu symmetrische Verlauf der Kurve spricht für einen kugelförmigen Aufbau der Mizellen.

Die PDDF bei liposomalen Strukturen sieht anders aus. Hier ist der Partikel als Ganzes zu groß, um noch von der Kamera erfasst zu werden. Man erhält also im Wesentlichen Informationen über den Aufbau des begrenzenden Bilayers. Die PDDF nach Auswertung nach der Kugelsymmetrie - also über alle drei Raumrichtungen - zeigt zu Beginn eine Oszillation positiv - negativ (Abbildung 3.9). Dies ist typisch für liposomale Strukturen, da die Hülle einen inhomogenen Aufbau besitzt [19]. Unter der Annahme eines unendlich großen Plättchens kann man die PDDF senkrecht

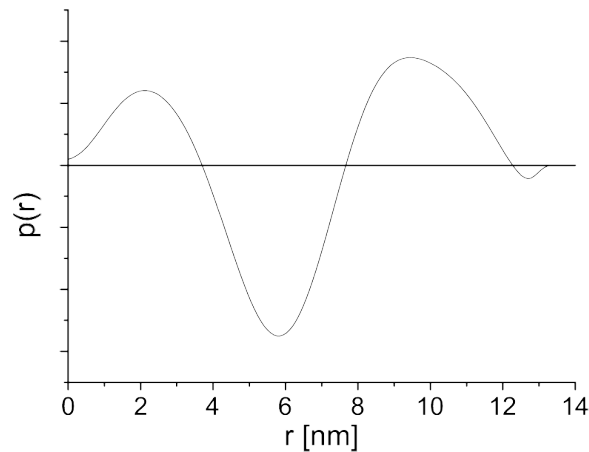


Abb. 3.8: Elektronenabstandsfunktion von wässrigen Solutol-Mizellen (1,0 %) ohne Lecithin.

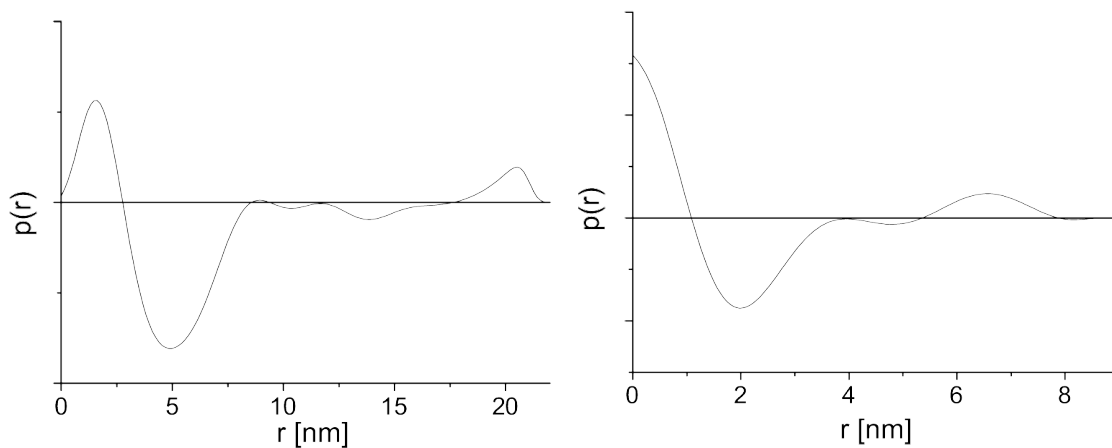


Abb. 3.9: PDDF der liposomalen Formulierung 1,0 % Solutol und 0,5 % P90G. Auswertung nach der Kugel- (links) und der Blättchensymmetrie (rechts).

durch die liposomale Hülle berechnen (Auswertung nach der Blättchensymmetrie). Hier ergibt der dritte Nulldurchgang die Dicke des Bilayers, also der Hülle (7,9 nm; Abbildung 3.9).

Anhand dieser Daten konnten die Systeme entsprechend der Tabelle 3.6 einem mizellaren oder liposomalen Aufbau zugeordnet werden. Die mittels PCS beobachtete sprunghafte Vergrößerung der Partikel bei einem Lecithingehalt von 0,5 % lässt sich also durch einen Wechsel vom mizellaren in ein liposomales System erklären.

Die mit Hilfe von SAXS bestimmte Größe der Mizellen ist in jedem Fall kleiner als bei der PCS, wobei auch hier die Solubilisierung von Lecithin eine Vergrößerung der Mizellen bewirkt. Der Größenunterschied liegt in den Messmethoden begründet. Während bei SAXS-Messungen die Größe der reinen Mizelle ermittelt wird, ist das Ergebnis der PCS-Messungen der hydrodynamische Radius. Der hydrodynamische

Radius gibt die Größe des sich bewegenden Partikels an, enthält also zusätzlich die anhaftende Wasserschicht, die sich mit der Mizelle bewegt.

Die Dicke der Hülle nimmt mit zunehmendem Gehalt an Lecithin von 7,9 nm zu 4,4 nm ab. Der Grund ist die kleinere molekulare Größe von Lecithin im Verhältnis zu Solutol.

Die SAXS-Referenzsysteme wurden im Anschluss der gleichen Zentrifugation wie die nanopartikulären Formulierungen unterworfen. Mit diesem Experiment soll untersucht werden, ob die gebildeten Assoziate die Filter passieren und im Filtrat nachgewiesen werden können. Die Streukurven der Filtrate entsprechen dabei denen der Ausgangssysteme. Lediglich die Intensität der Streuung durch die Partikel nimmt bis zu 10 % ab. Dies liegt an einem Verstopfen des Filters und/oder Adsorption am Filtermaterial. Die Aggregate können also bei der Zentrifugation den Filter nahezu quantitativ passieren, wobei der Aufbau unverändert bleibt.

Feste Lipidnanopartikel

Die Streukurven der Filtrate der Nanopartikelformulierungen entsprechen den Streukurven von bidestilliertem Wasser mit 0,005 % Thiomersal. Es liegen also keine – zumindest nicht in nachweisbaren Konzentrationen – mizellaren oder liposomalen Aggregate vor. Dies gilt sowohl für Systeme mit 5 als auch 15% Lipidmatrix.

Das Ergebnis ist überraschend, da es im Widerspruch zu anderen Arbeiten steht. Siekmann und Westesen konnten mit Cryo-Mikroskopischen Aufnahmen von festen Lipidnanopartikeln, die mit einem Phospholipid-Gallensalz Gemisch stabilisiert wurden, zeigen, dass in der wässrigen Phase Liposomen gebildet werden, wobei sie auch beobachtet haben, dass in Suspensionen die Zahl der gebildeten Vesikel geringer war als in Emulsionen [54]. Westesen und Wehler konnten für parenterale, mit Phospholipid stabilisierte Emulsionen, ebenfalls die Bildung liposomaler Strukturen nachweisen [53].

Als Argument für die Abwesenheit kann angeführt werden, dass Schubert und Müller-Goymann bei Zetapotentialmessungen keine Änderung des Zetapotentials mit einer Änderung der Lecithinkonzentration beobachteten [8]. Daraus kann geschlossen werden, dass die Einarbeitung von Lecithin nicht zu einer grundlegenden strukturellen Änderung des Systems - wie z.B.: der Bildung von Vesikeln - führt.

Die Abwesenheit kolloidaler Aggregate deutet darauf hin, dass sich Lecithin und Solutol entweder in der Matrix und/oder in Lamellen um die Matrix herum aufhalten. Da SOL ein hydrophiler Emulgator ist, erscheint ein Einbau in die Lipidmatrix

nicht wahrscheinlich. Wahrscheinlicher ist, dass Solutol sich in Lamellen um die Nanopartikel aufhält. Dafür spricht ebenfalls, dass die Beladungskapazität von SLN insbesondere für hydrophile Bestandteile sehr gering ist [71, 5].

Variation des Solutolgehalts

Wird der Gehalt an Solutol verändert (1,0 %, 1,67 % und 2,5 % SOL im Gesamtsystem), können im Filtrat ebenfalls keine zusätzlichen kolloidalen Strukturen nachgewiesen werden. Da eine Erhöhung der Solutolkonzentration für eine weitere Partikelgrößenverkleinerung sorgt (s. Abschnitt 3.3.1), wird es wahrscheinlich vollständig für die Stabilisierung der Grenzfläche verbraucht. Somit ist es nicht verwunderlich, dass eine Änderung des Solutolgehalts zu keiner Bildung zusätzlicher kolloidaler Strukturen führt.

3.3.5 NMR

NMR-Messungen wurden eingesetzt, um Informationen über die chemische Umgebung und die Mobilität der Solutol- und Lecithin-Moleküle zu erhalten. Die zugrunde liegende Physik ist eine Anregung der Kerne (hier: ^1H bzw. ^{31}P) durch elektromagnetische Wellen. Jeder Kern hat eine bestimmte Resonanzfrequenz, bei der im Spektrum ein Absorptionspeak zu erkennen ist. Die chemische Umgebung der Kerne variiert je nach funktionellen Nachbargruppen und eingesetztem Lösungsmittel, was eine Verschiebung der Resonanzfrequenz bewirkt. Jedes Molekül hat also ein charakteristisches Absorptionsspektrum. Die Verschiebung im Vergleich zu einem Standard (hier: D_2O bzw. H_3PO_4) wird als chemische Verschiebung δ bezeichnet. Ihre Größe resultiert aus [72]:

dem lokalen Beitrag aus der Elektronenkonfiguration des Kerns.

dem molekularen Beitrag durch den Einfluss der benachbarten Atomgruppen des Moleküls. Dieser kann z.B. auch bei einer Konformationsänderung des Moleküls verändert werden.

dem Solvensbeitrag durch Wechselwirkung mit dem Lösungsmittel oder anderen Molekülen in direkter Nachbarschaft zum Kern.

Werden einem Kern die abschirmenden Elektronen entzogen, spricht man von einer Entschirmung, die eine chemische Verschiebung zu großen δ (Tiefeldverschiebung)

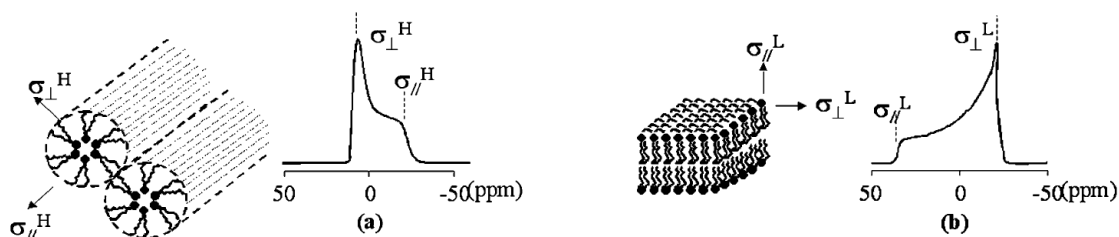


Abb. 3.10: Schematische Darstellung der Bildung anisometrischer ^{31}P -NMR Signale beim Vorliegen anisometrischer Flüssigkristall-Strukturen in Lecithin. (a) invers hexagonal (b) lamellar [73]

bewirkt. Eine Abschirmung durch eine hohe Elektronendichte um den Kern führt entsprechend zur Hochfeldverschiebung.

Informationen über die Mobilität eines Kernels können aus den erhaltenen Spektren ebenfalls gewonnen werden. Zu diesem Zweck wird die Halbwertsbreite $\nu_{1/2}$ verwendet, die im reziproken Zusammenhang mit der Relaxationszeit der Kerne steht. Die Relaxationszeit ist die mittlere Zeit, die der Kern benötigt, um vom angeregten Zustand durch spontane Quantenemission in den nicht-angeregten Zustand zu wechseln. Kurze Relaxationszeiten bedeuten, dass der Kern die Energie leicht an die Umgebung abgeben kann. Dies ist der Fall, wenn er stark immobilisiert (z.B. im Kristallgitter) vorliegt. Eine große Halbwertsbreite bedeutet also eine geringe Mobilität des Kernels. Sehr stark immobilisierte Kerne können nur mittels Feststoff-NMR nachgewiesen werden.

Zusätzlich können Informationen über die Art der Struktur, in die das Molekül eingebaut ist, erhalten werden. Bei isotropen Strukturen (z.B. Mizellen, inverse Mizellen, unilamellare Liposomen und kubische Flüssigkristalle) erhält man ein einfaches Signal. Liegen jedoch anisotrope Strukturen (lamellare und hexagonale Flüssigkristalle) vor, ist die chemische Verschiebung des Kernels zusätzlich abhängig von der Richtung, aus der das magnetische Feld einwirkt. Es kommt zur Ausbildung einer anisotropen chemischen Verschiebung, wie sie in Abbildung 3.10 dargestellt ist [73]. Das NMR-Spektrum multilamellarer Liposomen entspricht aufgrund des lamellaren Aufbaus der Hülle dem eines lamellaren Flüssigkristalls [74]. Diese Art der Untersuchung wird meistens mit ^2H - oder ^{31}P -NMR durchgeführt, da bei ^1H -NMR auch ohne Anisotropie bereits viele Signale vorliegen. Liu et al. zeigen allerdings, dass diese Untersuchung auch an ^1H -NMR-Spektren möglich ist [73].

^1H -NMR

Zunächst wurden Referenzsysteme mit bekannten kolloidalen Strukturen untersucht. Für die Herstellung wurden die gleichen Konzentrationen eingesetzt, wie sie in einer

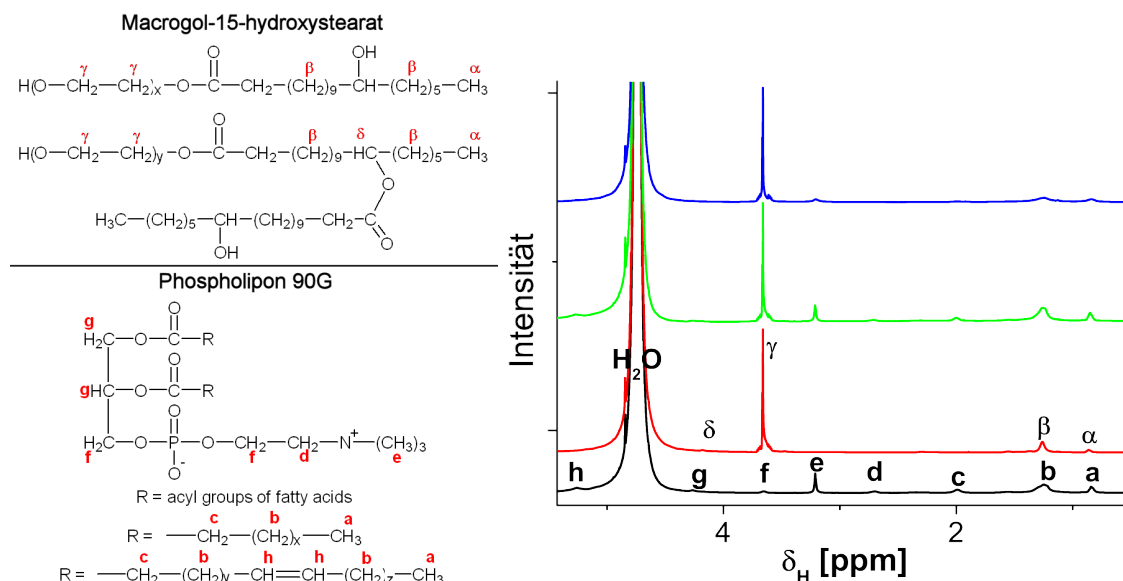


Abb. 3.11: ^1H -NMR von Referenzsystemen. Die Bezeichnung der Signale entspricht der Bezeichnung der H-Atome in den Strukturformeln (SOL: $x = y \approx 15$). (schwarz: 4,5 % P90G, rot: 3,0 % SOL, grün: 4,5 % P90G und 3,0 % SOL, blau: Lipidnanopartikel mit 30 % P90G in der Matrix)

Lipidnanopartikelformulierung mit 15 % Lipidmatrix und 30 % Lecithin in der Matrix vorliegen. Anhand von Literaturdaten können die Peaks den jeweiligen funktionellen Gruppen von SOL und P90G zugeordnet werden (Abbildung 3.11) [43, 57, 75]. Methyl- ($-\text{CH}_3$) und Methylengruppen ($-\text{CH}_2-$) weisen bei Fettsäuren typischerweise ein δ von 0,9 bzw. 1,3 ppm auf (P90G: a und b; Solutol: α , β). Durch die elektronenziehenden benachbarten funktionellen Gruppen werden z. B. die Methylgruppen des Ammoniums im Lecithin (e, 3,2 ppm) stark entschirmt. Ebenso durch den Elektronenzug der Sauerstoffatome erklärt sich die Position der Methylengruppen in den Ethoxygruppen von Solutol (γ , 3,7 ppm). Die Signale können den lipophilen bzw. hydrophilen Bereichen der amphiphilen Moleküle zugeordnet werden. Die Hauptsignale der lipophilen Bereiche sind: a, b für P90G und α , β für Solutol und der hydrophilen Bereiche: e für P90G und γ für Solutol. Da die Systeme nicht in Deuteriumoxid, sondern Wasser hergestellt wurden, befindet sich bei 4,7 ppm der Lösungsmittelpeak.

Lecithin bildet in Wasser vorzugsweise Liposomen. Dabei sollte es sich durch die Beschallung um kleine unilamellare Vesikel handeln. Die ^1H -NMR-Spektren bestätigen dies. Sämtliche Signale sind verhältnismäßig breit. P90G liegt also in Aggregaten und nicht gelöst vor. In Übereinstimmung mit den SAXS-Untersuchungen konnte bei keinem der Signale eine anisotrope chemische Verschiebung beobachtet werden, was für isotrope, unilamellare Vesikel spricht.

Solutol liegt in Wasser mizellar vor (s. 3.3.4). Die großen hydrophilen Reste reichen weit in die wässrige Phase und erreichen dadurch eine große Mobilität. Dies erklärt das scharf ausgeprägte Signal γ . Die anderen Signale weisen eine größere Halbwertsbreite auf. Solutol bildet also Aggregate. Diese sind isotrop, da auch hier keine anisometrischen Signale beobachtet werden können.

Das Spektrum des Systems mit P90G und SOL, das ebenfalls eine liposomale Struktur aufweist (s. 3.3.4), ergibt sich aus der Summe der Einzelspektren. Die Mobilität ist also unverändert im Vergleich zu den reinen wässrigen Formulierungen. Auch hier kann ein Vorliegen anisotroper Strukturen nicht beobachtet werden.

In der Lipidnanopartikel-Formulierung mit 15 % Lipid und 30 % Lecithin in der Matrix können keine zusätzlichen Signale durch die ebenfalls enthaltenen Triglyceride nachgewiesen werden, was auf eine vollständige Kristallisation des S154 schließen lässt. Im Vergleich zur Dispersion mit SOL und P90G ist die Intensität der Signale der lipophilen Gruppen deutlich vermindert. Gründe für die verringerte Mobilität der lipophilen Bereiche können sein:

- Einbau in die Kristallstruktur der Triglyceride
- Anlagerung an die lipophile Grenzfläche der Lipidnanopartikel

Die Signale der hydrophilen Gruppen verhalten sich für Solutol und P90G unterschiedlich. Während das Signal γ (Solutol) unverändert bleibt, ist das Signal ϵ (P90G) stark reduziert. Die Mobilität des hydrophilen Teils von Solutol ist also unverändert, es ragt in das wässrige Dispersionsmittel hinein. Da die Intensität der Signale der lipophilen Gruppen bei den Lipidnanopartikeln sogar geringer ist als im reinen Solutol-Referenzsystem, ist es wahrscheinlich mit dem lipophilen Teil an die Grenzfläche der Partikel gebunden. Im Unterschied dazu ist die Mobilität des hydrophilen Teils von Lecithin stark eingeschränkt. Dies deutet daraufhin, dass entweder ein Teil des Lecithins in die Kristallstruktur eingebaut ist und/oder eine Anlagerung des Lecithins an die Oberfläche erfolgt ist. Im Fall der Anlagerung an die Oberfläche müsste das Lecithin sehr fest angelagert sein, so dass eine geringere Beweglichkeit des hydrophilen Teils resultiert.

Zur Beurteilung des Einflusses der Lecithinkonzentration wurden an den Systemen mit einem Lecithinanteil von 20-50 % NMR-Messungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.12 dargestellt.

Das Signal der hydrophilen Gruppe des Solutol (γ) ist unabhängig von der Konzentration des Lecithins in der Matrix. SOL bildet also wahrscheinlich immer die

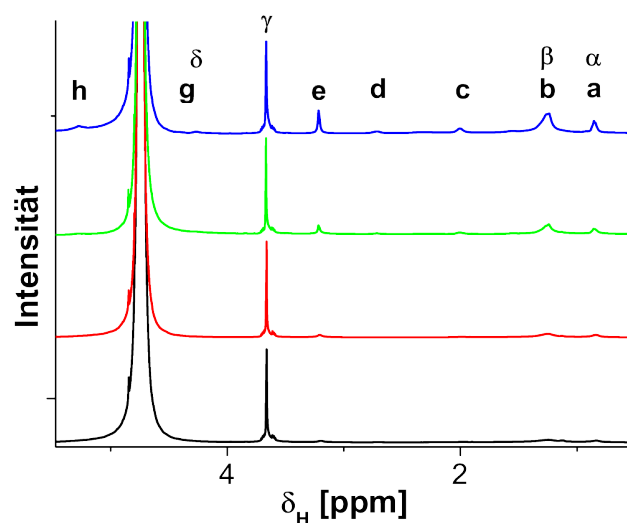


Abb. 3.12: ^1H -NMR von Lipidnanopartikel-Formulierungen mit unterschiedlichem Gehalt an P90G (schwarz: 20 %, rot: 30 %, grün: 40 %, blau: 50 % P90G in der Matrix)

äußerste Hülle der Partikel. Die Signale der lipophilen Gruppen – ebenso wie das Signal der hydrophilen Gruppe e des Lecithins – sind bei Konzentrationen bis 30 % sehr klein, was für eine geringe Mobilität und entsprechend feste Bindung spricht. Bei Konzentrationen über 30 % ist ein überproportionaler Anstieg der Peakintensität dieser Signale zu beobachten. Das spricht dafür, dass überschüssiges Lecithin nicht mehr so fest in die Grenzfläche eingebaut wird. Für den Aufenthaltsort des überschüssigen Lecithins gibt es zwei Möglichkeiten:

- in der wässrigen Phase: dort bildet es liposomale oder mischmizellare Strukturen
- an der Grenzfläche: dort bildet es zusätzliche Lamellen um die Nanopartikel.

Zwar führt auch eine Erhöhung des Lecithinanteils zu einem Anstieg der Signalintensitäten. Dieser Effekt kann hier jedoch als alleinige Ursache für den Intensitätsanstieg ausgeschlossen werden, da sich in diesem Fall die Intensitäten proportional zur Konzentration verhalten müssten.

Wie bereits oben erwähnt, bildet Solutol wahrscheinlich immer die äußerste Hülle der Partikel. Hierbei kann jedoch nicht unterschieden werden, ob es sich in Liposomen oder im äußersten Layer, der die Nanopartikel umgibt, aufhält.

^{31}P -NMR

Zusätzliche Informationen über die Mobilität des Phosphors in der hydrophilen Gruppe des Lecithins können aus ^{31}P -NMR-Messungen gewonnen werden.

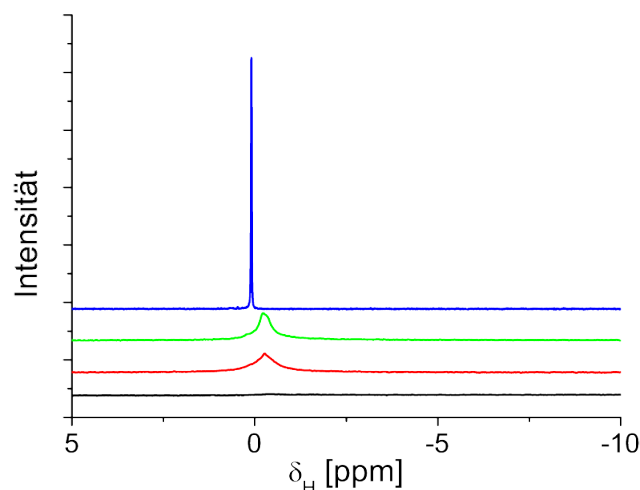


Abb. 3.13: ^{31}P -NMR-Spektren der Referenzsysteme (schwarz: SLN mit 30 % P90G, rot: 4,5 % P90G und 3,0 % SOL, grün: 4,5 % P90G, blau: 4,5 % P90G in Ethanol).

Für diese Untersuchungen wurden ebenfalls Referenzsysteme mit bekannten Strukturen hergestellt und vermessen (Abbildung 3.13). Die Mobilität der hydrophilen Phosphatgruppe des Lecithins ist in den kolloidalen Referenzsystemen deutlich vermindert im Vergleich zur ethanolischen Lösung. Zusätzlich verschiebt sich die Position des Peaks von 0,1 ppm (in Ethanol) zu $-0,3$ ppm. Diese Hochfeldverschiebung wird durch die unterschiedlichen Lösungsmittel hervorgerufen.

Analog zu den ^1H -NMR Untersuchungen ist das Signal im nanopartikulären Referenzsystem kaum nachweisbar. Dies weist auf eine verstärkte Immobilität und damit entweder einen Einbau in die Kristallstruktur der Matrix oder die Bildung eines sehr fest an die Oberfläche der Partikel gebundenen Lecithinlayers hin.

Um die Abhängigkeit von der Lecithinkonzentration in der Matrix zu untersuchen, wurden die entsprechenden Formulierungen vermessen (Abbildung 3.14). Liegt die Konzentration bei 20 %, ist ein Signal sehr niedriger Intensität und einer großen Halbwertsbreite (etwa 0 bis -15 ppm) zu erkennen. Wird die Konzentration an Lecithin auf 30 % erhöht, bildet sich zusätzlich ein Signal bei $-0,3$ ppm aus. Wie bereits im Vorfeld beschrieben, deutet ein Signal mit großer Halbwertsbreite auf eine feste Bindung des Lecithins an die Oberfläche hin. Zusätzlich kann eine Verringerung der Signalintensität durch Immobilisation des Lecithins in der Matrix nicht ausgeschlossen werden.

Bei Konzentrationen über 30 % Lecithin kommt es zum überproportionalen Anstieg des Signals bei $-0,3$ ppm. Eine mögliche Ursache ist, dass – ab einer kritischen Konzentration von ca. 30 % – Lecithin nicht mehr zur Stabilisierung der Grenzfläche der Emulsionströpfchen beitragen kann. Als Folge kann es für die Bildung zusätz-

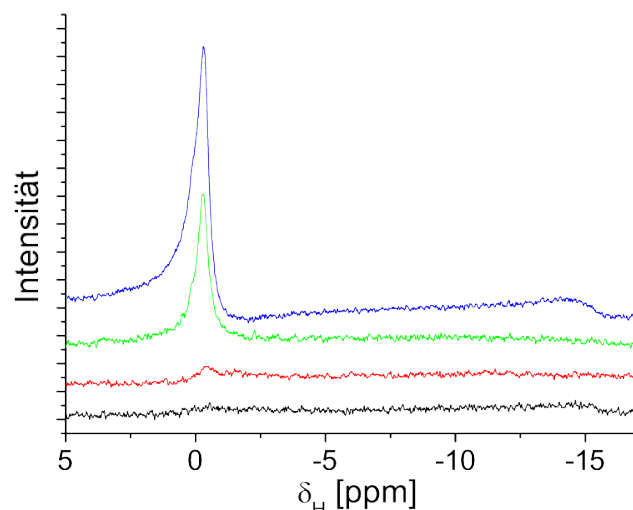


Abb. 3.14: ^{31}P -NMR-Spektren der Lipidnanopartikel-Formulierungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Lecithin (schwarz: 20 %, rot: 30 %, grün: 40 %, blau: 50 % P90G in der Matrix).

licher Lamellen um die Partikel bzw. mischmizellarer oder liposomaler Strukturen außerhalb der Partikel verwendet werden.

3.3.6 IR

Mit Hilfe der Infrarot-Strahlung können Moleküle zum Schwingen angeregt werden. Je nach Aufbau des Moleküls ergibt sich ein charakteristisches Absorptionsspektrum. Dieses kann z.B. zur Strukturaufklärung von Molekülen verwendet werden. Im vorliegenden Fall soll ausgenutzt werden, dass sich die Position der Absorptionsspeaks verschiebt, wenn sich die lokale Umgebung der funktionellen Gruppen, die eine Schwingung hervorrufen, ändert. Derartige Änderungen können über Wasserstoffbrückenbindungen, eine Änderung der Konformation eines Moleküls sowie eine Änderung des Kristallgitters hervorgerufen werden.

Um Aussagen über Lecithin und Hartfett machen zu können, wurden IR-Spektren der Lipidmatrices (20-50 % P90G), der korrespondierenden Lipidnanopartikel nach Gefriertrocknung (beide: 1 Monat nach Herstellung) sowie der Einzelsubstanzen aufgenommen. Die Gefriertrocknung musste aufgrund der Störung der IR-Messungen durch Wasser erfolgen. Sie birgt jedoch die Gefahr, dass die nanopartikulären Systeme aufgrund der Einfrier- und Auftauprozesse, sowie durch Wasserentzug verändert werden.

Tab. 3.7: Wellenzahlen der asymmetrischen O=P-O⁻-Streckung des Phosphorsäureesters bei 1245 cm⁻¹ und der symmetrischen N-CH₃-Streckung des Cholin-Restes mit Gauche (876 cm⁻¹) und Trans-Schwingung (920 cm⁻¹).

Formulierung	Wellenzahl [cm ⁻¹]		
	1245 cm ⁻¹	876 cm ⁻¹	920 cm ⁻¹
Liposomen	1246	875	919
Matrix (20-50% P90G)	1243	875,5	919
Nanopartikel (20-50% P90G)	1246	875,5	919

Lecithin

Für funktionelle Gruppen in Membranen haben Fringeli und Günthard die möglichen Signale im IR-Spektrum aufgelistet [76]. Eine Zuordnung der Signale zum verwendeten Lecithin ist von Mackeben durchgeführt worden [77].

Die meisten Signale, die eine Aussage über die Konformation des Lecithins erlauben, werden von Signalen von SOL und S154 überlagert, so dass eine Aussage nicht möglich ist. Dies betrifft u.a. die Signale der Esterfunktion.

Bei 1245 cm⁻¹ findet sich die asymmetrische O=P-O⁻-Streckung des Phosphorsäureesters. Die Position dieses Signals ist unabhängig von der Konzentration des eingesetzten Lecithins (Tabelle 3.7). Aber es zeigte sich eine schwache Abhängigkeit von der Art der Zubereitung. Dieses Signal wird im Wesentlichen durch zwei Effekte beeinflusst [78]:

- durch Hydratisierung kommt es zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke, die zu einer bathochromen Verschiebung (größere Wellenzahlen) führt
- durch das Kristallisationsmedium

Da das Wasser aus den Formulierungen entfernt wurde, kann es die Verschiebung nicht direkt erklären. Aufgrund der hygroskopischen Eigenschaften des P90G könnte es jedoch zu einer schwachen Adsorption von Luftfeuchtigkeit während der Probenpräparation kommen, die die leichte bathochrome Verschiebung bewirkt. In der Matrix ist P90G in S154 inkorporiert und damit besser vor Luftfeuchtigkeit geschützt als in den Liposomen. Die Verschiebung könnte also ein Indiz für die Bildung von Liposomen oder die Bildung von Lamellen um den Hartfettkern sein. Unabhängig von der Lokalisation des Lecithin bietet aber auch die kleinere Partikelgröße der Nanopartikel und der Liposomen im Vergleich zur reinen Matrix eine bessere Angriffsfläche für Luftfeuchtigkeit.

Ein anderer Grund für die Verschiebung kann das Kristallisationsmedium beim Gefriertrocknungsprozess der Nanosuspension und der Liposomenformulierung sein. Das ist im Fall der Liposomen Wasser und im Fall der Matrix S154. Dies könnte für Wasser als Kristallisationsmedium bei den SLN sprechen.

Die symmetrische N-CH₃-Streckung des Cholin-Rests kann bei zwei unterschiedlichen Wellenzahlen (920 cm⁻¹ (Trans) und 876 cm⁻¹ (Gauche)) erfolgen, die Position ist abhängig davon, ob die O-C-C-N-Achse des Cholinrestes sich in Trans oder Gauche-Konformation befindet. Im kristallinen Zustand liegt Lecithin bevorzugt in der Gauche-Form vor [76]. Eine Änderung der Signale in Bezug auf die Konzentration bzw. die Formulierungsart ist nicht festzustellen (s. Tabelle 3.7). Auch dies ist wahrscheinlich auf das fehlende Wasser zurückzuführen, da insbesondere eine Hydratisierung des Lecithins eine verstärkte Umlagerung in die Trans-Form bewirkt [76].

Hartfett

Die IR-Spektren können des Weiteren verwendet werden, um Aussagen über die polymorphe Struktur des Hartfetts zu machen. Zu diesem Zweck kann das Signal bei ca. 720 cm⁻¹ herangezogen werden. Diese Bande wird durch eine CH₂-Deformationsschwingung (rocking) hervorgerufen. Sie ist charakteristisch für lange, kristalline Fettsäurereste, bei denen die Ketten in all-trans Konfiguration vorliegen [76]. Für die drei unterschiedlichen polymorphen Formen des Hartfetts sieht das Signal wie folgt aus [47]:

α -Modifikation Singulett bei 720 cm⁻¹

β' -Modifikation hier gibt es Unterformen: Singulett bei 719 cm⁻¹ (β'_1) oder ein Duplett bei 719 cm⁻¹ und 726 cm⁻¹ (β'_2)

β -Modifikation Singulett bei 717 cm⁻¹

Unbehandeltes S154 weist eine Bande bei 719,2 und 727,2 cm⁻¹ auf. Dies entspricht der β'_2 -Modifikation. Wird es aufgeschmolzen, ändert sich die Position nach dem Erstarren auf 721,4 cm⁻¹. Es liegt also in der α -Modifikation vor.

Abbildung 3.15 zeigt die entsprechende Bande der Lipidmatrices. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass der Zusatz von Lecithin die Bildung eines Dupletts also der β'_2 -Modifikation bewirkt. Mit steigendem Lecithingehalt wird die Schulter bei ca. 726 cm⁻¹ ausgeprägter, was für einen steigenden Anteil der β'_2 -Modifikation spricht.

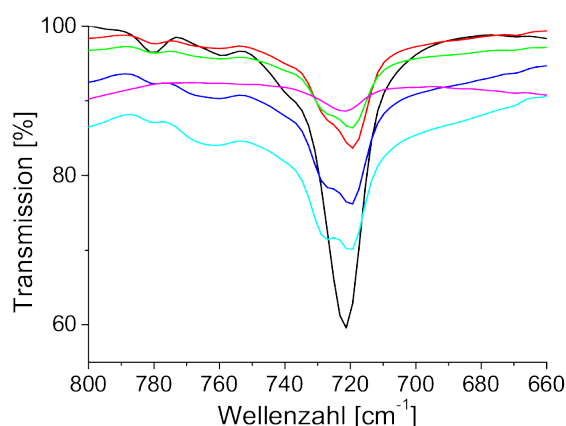


Abb. 3.15: IR-Bande der CH_2 -Deformationsschwingung bei 720 cm^{-1} , in Lipidmatrices mit unterschiedlichem Gehalt an P90G nach 1 Monat Lagerung (schwarz: 0 %, rot: 20 %, grün: 30 %, blau: 40 %, hellblau: 50 % P90G) und gefriergetrockneten Liposomen (rosa).

Schubert et al. beschreiben, dass der Zusatz von P90G zu Hartfett eine beschleunigte Transformation von der α - in die β -Form bewirkt [10]. Da das Signal der α -Form sehr dicht bei dem Signal der β' -Form liegt, kann es hier nicht nachgewiesen werden. Die Bildung der β'_2 -Form, als nächststabilere Form, aus der α -Modifikation ist jedoch wahrscheinlich. Eine Schulter bei 717 cm^{-1} , die für das Vorliegen der stabilen β -Modifikation sprechen würde, kann nicht nachgewiesen werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass ein Anteil in der β -Modifikation vorliegt, der jedoch unter der Nachweisgrenze ist. Ob die etwas stabilere β'_1 -Form neben der β'_2 -Form vorliegt, kann aufgrund der gleichen Position der Signale nicht nachgewiesen werden.

Unabhängig vom Lecithingehalt weisen sämtliche Nanopartikelformulierungen eine Bande bei $717,5\text{ cm}^{-1}$ auf. Sie liegen also, wie bereits über Röntgen- und DSC-Daten in früheren Arbeiten beschrieben [10], in der stabilen β -Modifikation vor.

Auch Lecithin enthält lange Fettsäurereste, die kristallin vorliegen können. Das resultierende Signal ist jedoch verglichen mit dem Signal der Matrices sehr gering und liegt bei 721 cm^{-1} (Abb.: 3.15). Die geringe Signalintensität kann durch eine geringere Kristallinität des Lecithins im Vergleich zum Hartfett begründet werden. Aufgrund der geringen Kristallinität des Lecithins wird davon ausgegangen, dass es die Bestimmung der polymorphen Form des Hartfetts nicht beeinträchtigt.

Solutol

Die Solutol-Signale sind zu schwach, um neben den beiden anderen Substanzen ausgewertet werden zu können.

3.4 Abschlussdiskussion

3.4.1 Kristallstruktur des Hartfetts

Hartfett kristallisiert in einer lamellaren Struktur aus. Dies konnte mit Hilfe von TEM und Röntgenkleinwinkelbeugung nachgewiesen werden. Die Bildung des lamellaren Aufbaus ist unabhängig davon, ob es nanopartikulär oder als Matrix vorliegt.

In welcher polymorphen Form es nach einem Monat Lagerung vorliegt, ist abhängig von der Art der Formulierung und dem Gehalt an P90G. So haben IR-Messungen gezeigt, dass ein Zusatz von Lecithin zur Lipidmatrix die Bildung eines größeren Anteils der β'_2 -Form bewirkt. Diese Beobachtung ist im Einklang mit der von Schubert et al. beschriebenen beschleunigten Umlagerung der α - in die β' -Modifikation [10]. Des Weiteren konnten die IR-Messungen das Vorliegen der Nanopartikel in der stabilen β -Form unabhängig vom Lecithingehalt, wie es zuvor von Schubert et al. beobachtet wurde, bestätigen [10]. Diese Ergebnisse werden zusätzlich durch die SAXD-Untersuchungen unterstützt. Diese zeigen, dass Hartfett in der LM und den SLN in der β oder β' -Modifikation vorliegt.

3.4.2 Lokalisation von Lecithin

Matrix

Da sowohl Hartfett als auch Lecithin in Lamellen auskristallisieren, die einen ähnlichen Netzebenenabstand aufweisen, kann mit Hilfe der TEM-Aufnahmen keine Aussage darüber getroffen werden, ob Lecithin als Mischkristall oder getrennt vom Hartfett auskristallisiert. Bei Konzentrationen ab 30 % Lecithin in der Matrix konnte von Schubert et al. mit Hilfe der Röntgenweitwinkelbeugung beobachtet werden, dass Lecithin zum Teil getrennt von Hartfett kristallisiert [10].

Eine vorangegangene Arbeit mit einem niedriger schmelzenden Hartfett zeigte die Bildung von sphärischen Aggregaten in der Matrix. Dies wurde der Bildung einer festen invers mizellaren Lösung zugeschrieben [6]. Derartige Aggregate konnten in den vorliegenden Matrices nicht nachgewiesen werden. Eine mögliche Begründung kann das Fehlen kurzer Fettsäureketten im höher schmelzenden Softisan 154 sein. Für die Bildung inverser Mizellen ist eine Voraussetzung, dass das lipophile Lösungsmittel an der Bildung der lipophilen Mizellhülle beteiligt ist. Ist ein großer Anteil niedrig schmelzender Hartfette vorhanden, können diese zusammen mit Lecithin invers mizellare Bereiche in der Matrix bilden.

Lipidnanopartikel

Die Konzentration von 30 % Lecithin in der Matrix stellt unter vielen Gesichtspunkten eine kritische Konzentration für die festen Lipidnanopartikel dar:

- bis 30 % nimmt die Partikelgröße der Nanopartikel ab, eine weitere Erhöhung der Konzentration führt zu keiner weiteren Verringerung
- ^1H -NMR zeigt bei Konzentrationen über 30 % eine sprunghafte Zunahme der Mobilität von Lecithin. Dies betrifft sowohl die hydrophilen als auch die lipophilen Bereiche. Bei geringeren Konzentrationen liegt es stark immobilisiert vor.
- ^{31}P -NMR zeigt ebenfalls einen überproportionalen Anstieg des Signals bei höheren Konzentrationen

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Lecithin für die Stabilisierung der Grenzfläche der Emulsionstropfen während der Herstellung benötigt wird. Es kommt zu einer Verkleinerung der Partikelgröße, da zusätzliches Lecithin für eine zusätzliche Stabilisierung der Grenzfläche sorgt. Dies ist jedoch nur bis zur kritischen Konzentration von 30 % Lecithin möglich. Eine weitere Konzentrationserhöhung führt nicht zu einer weiteren Partikelgrößenverkleinerung. Das überschüssige Lecithin wird nicht in die Hartfettpartikel eingebaut, denn in diesem Fall könnte es mit Hilfe der NMR-Messungen nicht nachgewiesen werden. Wahrscheinlicher ist die Bildung zusätzlicher Lamellen um die Hartfettpartikel, oder eine Diffusion in die wässrige Phase, wo mischmizellare oder liposomale Strukturen gebildet werden können.

Verschiedene Methoden wurden herangezogen, um die eventuelle Existenz liposomaler oder mizellarer Strukturen nachzuweisen:

- TEM Untersuchungen zeigten keine liposomalen Strukturen
- SAXS der Filtrate der SLN konnten keine Aggregate nachweisen

Mit beiden Methoden kann das Vorliegen derartiger Aggregate nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Denn TEM Untersuchungen zeigen immer nur einen kleinen Ausschnitt der Formulierung. Bei einem geringem Anteil an Liposomen können sie sich also trotz gründlicher Suche dem Nachweis entziehen.

Die Nachweisgrenze für Mizellen und Liposomen ist bei der Röntgenkleinwinkelstreuung sehr niedrig. Hier besteht die Unsicherheit jedoch im vorangegangenen Filtrationsschritt. Die Referenzsysteme konnten problemlos den Filter passieren und im

Filtrat mit einem nur geringen Intensitätsverlust nachgewiesen werden. Dies bedeutet jedoch nicht zwingend, dass dies für die nanopartikulären Systeme ebenfalls der Fall ist. Hier können die Poren des Filters durch die Partikel verstopfen. Zusätzlich kommt es beim Filtriervorgang zu einer verstärkten Annäherung der eventuell vorhandenen Aggregate an die Partikel, da die Aggregate die sedimentierte Schicht der Partikel passieren müssen. Dies kann zu einer verstärkten Adsorption an der Partikeloberfläche führen. Dementsprechend kann die Abwesenheit einer Streuung durch Aggregate lediglich als Indiz für die Abwesenheit von Mischmizellen oder Liposomen gewertet werden.

Der Beobachtung, dass keine Aggregate neben den Nanopartikeln nachgewiesen werden konnten, stehen andere Arbeiten entgegen. So konnte in Emulsionsformulierungen, die unter anderem mit Phospholipiden stabilisiert wurden, die Existenz von zusätzlichen Liposomen nachgewiesen werden [53, 54]. Wobei ebenfalls beobachtet wurde, dass in Suspensionen die Konzentration an Liposomen geringer war als in Emulsionssystemen [54]. Im Gegensatz dazu zeigte sich aber auch, dass sich bei den vorliegenden Systemen das Zetapotential der Nanopartikel nicht in Abhängigkeit von der Lecithinkonzentration ändert [8]. Dies widerspricht einer grundlegenden strukturellen Änderung wie sie bei der Bildung von zusätzlichen kolloidalen Aggregaten eintreten würde.

30 % Lecithin (bezogen auf die Matrix) sorgen für die Stabilisierung der größtmöglichen Grenzfläche. Unter der Annahme, dass das überschüssige Lecithin zusätzliche Lamellen um die Partikel bildet, stehen für diese lediglich bis zu 20 % Lecithin (als Differenz zu 50 % Lecithin bezogen auf die Matrix) zur Verfügung. Es wird also wahrscheinlich lediglich um einige Partikel ein zusätzlicher Phospholipid-Bilayer angelagert.

Wie groß der Anteil an Lecithin im Inneren der Nanopartikel ist, kann nicht bestimmt werden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass sich zumindest ein geringer Teil des Lecithins auch in der Kristallstruktur des Hartfetts befindet.

3.4.3 Lokalisation von Solutol

Die Bildung von Solutolaggregaten neben den Nanopartikeln ist unwahrscheinlich, da eine Erhöhung der Solutolkonzentration eine weitere Verkleinerung der Partikel bewirkt. Dies lässt sich leicht durch den größeren hydrophilen Rest des Solutols im Vergleich zum Lecithin erklären. Solutol kann damit kleinere ölige Emulsionstropfen stabilisieren. Des Weiteren konnten auch bei einer Erhöhung der Solutolkonzentration keine zusätzlichen kolloidalen Aggregate mittels SAXS nachgewiesen werden.

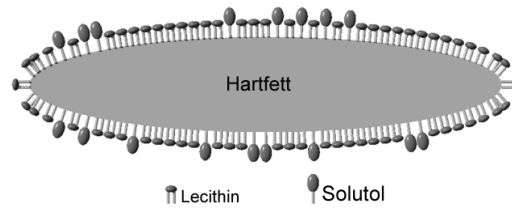


Abb. 3.16: Modell der oberflächenmodifizierten Lipidnanopartikel

Der Einbau von Solutol in die Hartfettpartikel kann aus den folgenden Gründen ebenfalls ausgeschlossen werden:

- Solutol ist ein hydrophiler Emulgator. Die Beladungskapazität von Lipidnanopartikeln insbesondere für hydrophile Stoffe ist gering [5, 71]
- Das ^1H -NMR Signal der hydrophilen Gruppe von Solutol ist in den nanopartikulären Systemen unverändert im Vergleich zum mizellaren Referenzsystem.

Die Signale der lipophilen Gruppen im ^1H -NMR-Spektrum weisen bis zu einer Konzentration von 30 % Lecithin in der Matrix eine sehr niedrige Intensität auf. Dies spricht nicht nur für die feste Bindung des Lecithins an die Grenzfläche der Nanopartikel sondern auch für die des Solutols. Gleichzeitig spricht das unveränderte Signal des hydrophilen Teils von Solutol für eine hohe Mobilität der hydrophilen Gruppe. Solutol befindet sich also in der Grenzfläche der Nanopartikel. Dabei ragen die großen hydrophilen Reste weit in das wässrige Medium. Solutol bildet also zusammen mit Lecithin die äußerste Schicht um die Partikel.

3.4.4 Modellvorstellung

Aus den vorgestellten Ergebnissen lässt sich ein Modell für durch Lecithin und Solutol oberflächenmodifizierte Lipidnanopartikel formulieren (Abb.: 3.16).

Der Kern der Partikel wird von Hartfett gebildet, wobei ein Einbau geringer Mengen an Lecithin in das Kristallgitter nicht ausgeschlossen werden kann. Bis zur kritischen Konzentration von 30 % bezogen auf die Matrix wird der Kern von einer wahrscheinlich monolamellaren Schicht von Solutol und Lecithin umgeben. Bei höheren Lecithinkonzentrationen wird das überschüssige Lecithin für die Bildung weiterer Lamellen um den Kern verwendet, wobei sich Solutol immer im äußersten Lecithinlayer befindet.

3.5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieses Teils der Arbeit wurden Lipidnanopartikel mit einem hohen Anteil an Lecithin physikochemisch charakterisiert. Da die untersuchten Partikel über eine Hochdruckhomogenisation in der Schmelze hergestellt wurden, wurde ein besonderes Augenmerk auf eine eventuelle Umverteilung des Lecithins aus den gebildeten Emulsionströpfchen gelegt.

Aus den unterschiedlichen Messungen konnte ein Modell oberflächenmodifizierter Lipidnanopartikel erstellt werden. Dieses beinhaltet einen Hartfettkern, der von einer mindestens monomolekularen Schicht Lecithin stabilisiert wird. Die äußerste Lecithinschicht enthält dabei zusätzlich Solutolmoleküle, die zur Stabilisierung der Partikel beitragen.

Des Weiteren ergänzten die verwendeten Methoden bereits vorliegende Daten zu den gebildeten polymorphen Formen des Hartfetts sowohl in der Matrix als auch in den Nanopartikeln. Dabei konnte bestätigt werden, dass der Zusatz von Lecithin zu Hartfett die Kristallisation in der β - und β' -Modifikation induziert und das Hartfett in den Nanopartikeln in der β -Modifikation vorliegt.

Kapitel 4

Struktur von Quil A-Assoziaten

4.1 Allgemeiner Teil

4.1.1 Saponine

Saponine, die von vielen Pflanzen aber auch einigen Meerestieren und Bakterien produziert werden, bilden eine heterogene Naturstoffgruppe [79]. Es handelt sich um häufig bitter schmeckende, oberflächenaktive, glykosidische Verbindungen, deren Zuckerreste durch Hydrolyse abgespalten werden können. Das Aglycon (Sapogenin) besteht aus einem Steroid- oder Triterpengrundgerüst, an das verschiedene Zuckermoleküle gebunden werden können. Dies kann an einer (monodesmosidische Saponine) oder zwei Positionen (bisdesmosidische Saponine) erfolgen [80]. Die Anwesenheit sowohl polarer als auch unpolarer Bereiche begründet die starke Oberflächenaktivität der Saponine. Die bisdesmosidischen Saponine besitzen dementsprechend ein lipophiles Ringgerüst, das an zwei Seiten polare Zuckerreste trägt, aufgrund dieser Eigenschaft können sie der Gruppe der Bolaamphiphile zugeordnet werden.

Sowohl in der Lebensmittelindustrie, als auch in der Pharmazie werden Saponine vielfältig eingesetzt, so ist z.B. ein Extrakt der Rinde von *Quillaja saponaria* Molina als Schaumbildner in der EU in Lebensmitteln zugelassen. Beispielhafte Anwendungen aus der Pharmazie sind: Expektorantien (*Primulae radix*, *Hederae folium*), Antiexsudativa (*Hippocastani semen*), Tonika (*Ginseng radix*) und Immunadjuvantien (*Quillaia cortex*).

Saponine können mit den Zellmembranen, und dort insbesondere mit Cholesterol interagieren [81, 82, 83]. Auf diesem Effekt beruht die hämolytische Eigenschaft, die viele Saponine aufweisen [80]. Sie wird durch eine Porenbildung innerhalb der

Zellmembran hervorgerufen [84]. Die gebildeten Poren in menschlichen Erythrocyten haben eine Größe von 4 - 5 nm [85]. Als Mechanismus der Läsionsbildung gilt die Aggregation von Saponin und Cholesterol zu einem mizellartigen Komplex innerhalb der Membran, wobei die planaren Ringgerüste der Moleküle den äußeren Rand der Läsion bilden [81, 82, 86]. Auch die antifungale Wirkung beruht auf einer Interaktion mit Sterolen der Zellmembran von Pilzen [80].

Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass mit bisdesmosidischen Saponinen eine Einlagerung in Liposomen auch unabhängig von Cholesterol erfolgen kann, da eine erhöhte Permeabilität von Calcein aus Liposomen beobachtet wurde [87].

Des Weiteren weisen Saponine immunologische Eigenschaften auf. Werden sie als Adjuvans zusammen mit einem Antigen verabreicht, können sie sowohl die zelluläre Immunantwort als auch die Antikörperproduktion stimulieren [88]. Oda et al. beobachteten, dass die Aktivität als Adjuvans unabhängig ist von der hämolytischen Aktivität, und dass für eine Wirkung als Adjuvans nicht bestimmte funktionelle Gruppen, sondern eher die Gesamtkonformation des Saponins wichtig ist [89].

Der Mechanismus der Immunstimulierung ist bisher noch nicht geklärt, wobei es mehrere Erklärungsansätze gibt. Aufgrund der Affinität zu Zellmembranen könnte es durch eine Inkorporation zu einer vereinfachten Antigenpräsentation an den cytosolischen Proteasen kommen [90]. Des Weiteren induzieren Saponine die Produktion von Zytokinen, wie Interleukin und Interferon, was die immunstimulierende Wirkung vermitteln könnte [88].

4.1.2 Quil A

In dieser Arbeit wurde ein wässriger, aufgereinigter Extrakt von *Quillaja saponaria* molina eingesetzt (Quil A) [91]. Der noch nicht aufgereinigte, wässrige Rohextrakt enthält 20 % Saponine sowie 80 % Tannine und Polyphenole [92]. Der wässrige Rohextrakt wird mittels Anionenaustauscher und Gelausschlusschromatographie zum „Quil A“ aufgereinigt [91]. Quil A enthält >90 % Saponine, die jedoch sehr heterogen sind [92]. Eine Reihe von Arbeiten hat sich mit der Aufreinigung und Identifizierung der im Quil A enthaltenen Triterpensaponine beschäftigt [93, 94, 95, 96]. Higuchi et al. klärten als erste den chemischen Aufbau eines der enthaltenen Saponine (QS-17) auf [93]. Der trimere Zuckerrest variiert in Quil A kaum, wohingegen der Zuckerrest an C28 vielfältig variiert (s. Tab. 4.1) [90]. Aufgrund der Glucuronsäure an C3 liegt Quil A bei physiologischem pH deprotoniert, also anionisch vor. Viele der Saponine in Quil A weisen eine Besonderheit in den hydrophilen Seitenketten gegenüber anderen Saponinen auf: Die Zuckerkette an C28 enthält zusätzlich eine Acylseitenkette.

Dies ist zum Beispiel auch der Fall bei den vier häufigsten Saponinen des Quil A (QS-7, QS-17, QS-18 und QS-21) (s. Tab. 4.1) [97, 98, 99].

Aufgrund der beiden hydrophilen Zuckerreste stellen die Saponine des Quil A bolaamphiphile Substanzen dar. Derartige Stoffe sind in der Lage, Mizellen im wässrigen Milieu zu bilden. Dabei liegt die CMC von Quil A bei 0,3 mg/ml [15, 91], kann aber je nach Hersteller sehr stark variieren (0,3 - 0,8 mg/ml) [13]. QS-21 weist eine CMC von 0,05 mg/ml auf [101].

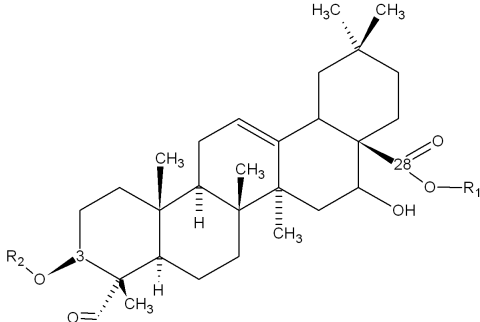
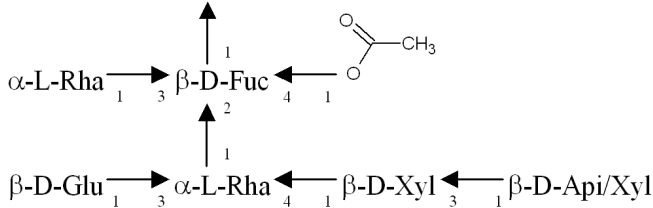
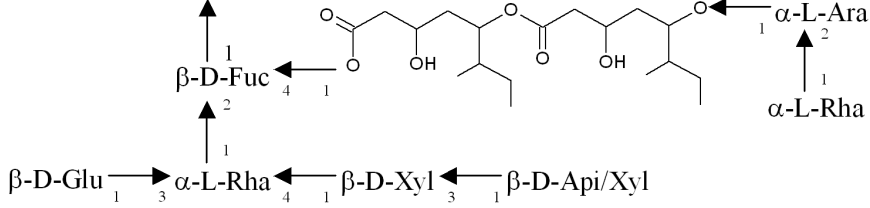
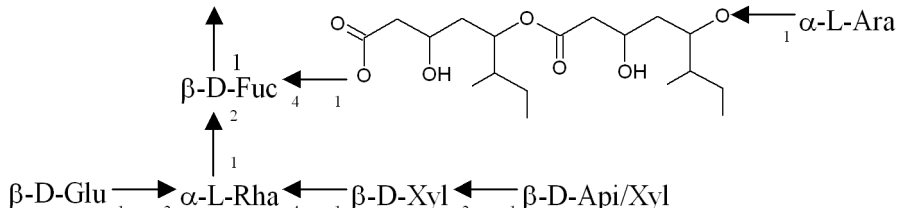
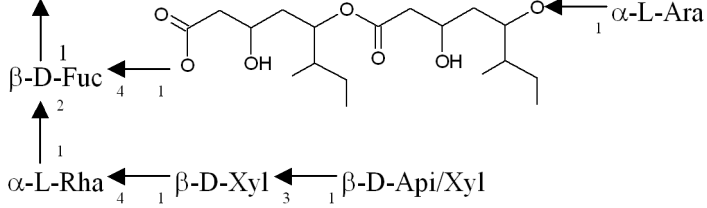
Wie bereits in Abschnitt 4.1.1 beschrieben, können Saponine mit Cholesterol interagieren. Die Solubilisierung eines Cholesterol-Films in einer wässrigen, mizellaren Quil A-Lösung führt zur Bildung von *wormlike micelles* (Abb.: 4.1) [18]. Dies unterstützt Ergebnisse von Mitra und Dungan, die ein Anwachsen von Quil A Mizellen mit zunehmendem Cholesterolgehalt beobachteten. Sie gehen dabei davon aus, dass Cholesterol als eine Art „Struktur-Katalysator“ dient. Des Weiteren konnten sie zeigen, dass die CMC des Quil A durch Cholesterolzusatz ansteigt [14]. Im Gegensatz dazu bewirkt eine Solubilisierung von Cholesterol in Quil A zusammen mit einem hydrophilen Emulgator, der im Anschluss durch Dialyse entfernt wird, die Bildung von *ringlike micelles* [102] oder ISCOMs [103]. Eine pseudoternäre Mischung von Lecithin, Cholesterol und Quil A bildet sogenannte ISCOM-Matrices, die in Abschnitt 4.1.2.1 weiter behandelt werden.

Solubilisiert man in Quillaja-Saponin Gallensalze, die ein dem Cholesterol ähnliches Ringgerüst mit etwas anderen funktionellen Gruppen aufweisen, können ebenfalls *wormlike micelles* nachgewiesen werden. Diese weisen eine deutliche helicale Überstruktur auf [104]. Die Tatsache, dass die gemischten Mizellen größer sind als die Mizellen der Gallensalze und der Saponine alleine, wird mit verminderten elektrostatischen und sterischen Wechselwirkungen begründet. Die großen, voluminösen Zuckerreste werden räumlich durch das dazwischen eingelagerte Natriumcholat getrennt. Gleichzeitig schirmen die Zuckerreste des Quil A die negative Ladung der Cholate ab.

Sowohl für die Solubilisierung von Cholesterol als auch für diejenige von Gallensalzen in Quil A wird angenommen, dass sich die in allen Molekülen ähnlichen planaren Ringgerüste zu lang gestreckten Würmern stapeln, wobei die hydrophilen Reste nach außen ragen [17, 104].

Die vorliegenden Saponine sind nicht lagerstabil, weswegen sie als gefriergetrocknetes Pulver mit begrenzter Haltbarkeit auf den Markt kommen. So unterliegt z.B. QS-21 insbesondere Hydrolyse und Isomerisierung im wässrigen Milieu [101, 98]. Erfolgt eine Esterhydrolyse des Acylrestes, verliert QS-21 seine Eigenschaft als Adjuvans

Tab. 4.1: Strukturformeln der Hauptbestandteile von Quil A (QS-7 [99], QS-17 [93], QS-18 [100] und QS-21 [97]).

<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Quillajasäure</p> </div> <div style="text-align: center;"> $\begin{array}{c} \beta\text{-D-Gal} \xrightarrow{1} \beta\text{-D-GlcA} \xrightarrow{1} 2 \\ \uparrow 3 \\ \beta\text{-D-Xyl} \xrightarrow{1} \end{array}$ <p>R2</p> </div> </div> <p style="text-align: center;">R1</p>	
<p>QS-7</p> <div style="text-align: center;">  </div>	
<p>QS-17</p> <div style="text-align: center;">  </div>	
<p>QS-18</p> <div style="text-align: center;">  </div>	
<p>QS-21</p> <div style="text-align: center;">  </div>	

[105], wobei das deacylierte Produkt als Enhancer wirkt [100]. Eine Isomerisierung von QS-21 zu QS-21B hingegen bewirkt keine Änderung für die Eignung als Adjuvans [101]. Die Hydrolyse wird basisch katalysiert, so dass die Formulierungen am besten einen pH von 5 - 6,5 aufweisen und bei niedrigen Temperaturen (2 - 8 °C) gelagert werden sollten. Im gefrorenen Zustand ist eine Lagerung auch bei höheren pH-Werten möglich [101]. Des Weiteren wird die Stabilität von QS-21 bei Konzentrationen oberhalb der CMC, wahrscheinlich aufgrund der innerhalb der Mizelle abgeschirmten Esterbindung, positiv beeinflusst [101].

Quillaja-Saponine können als Adjuvans bereits in sehr niedrigen Dosen eingesetzt werden [89]. Dabei konnte durch unterschiedlich aufgereinigte und auch isolierte Quillaja-Saponine eine Immunantwort über mehrere Mechanismen nachgewiesen werden [12]:

- Produktion spezifischer Antikörper
- Induktion der T-Zellantwort
- Induktion einer unspezifischen Immunantwort

Quil A konnte erfolgreich als Adjuvans bei Tieren eingesetzt werden [106]. Es weist jedoch in der nicht weiter aufgereinigten Form für den Einsatz beim Menschen eine zu hohe Toxizität auf (schwere lokale Reaktionen, Granulome und Hämolyse) [107]. Erst die höher aufgereinigten Extrakte QS-21 und ISCOPREP erlauben eine Entwicklung für Impfstoffe am Menschen [108, 109]. Kensil gibt einen umfassenden Überblick über aktuelle klinische Studien, die sich im Wesentlichen mit der Impfstoffentwicklung gegen Krebs (Haut,- Brust,- Prostatakrebs sowie chronische myeloische Leukämie) und Infektionskrankheiten (HIV, Influenza und Malaria) beschäftigen [12].

Wie bereits oben beschrieben, scheint die Acylkette dabei für die Funktion als Adjuvans eine wichtige Rolle zu spielen, da die deacylierten Formen von QS-18 und QS-21 keine starke Immunantwort in Mäusen hervorrufen [110, 97]. Des Weiteren wurde die Säurefunktion der Glucuronsäure und die Aldehydgruppe des Aglycons als essentiell für die Immunstimulierung identifiziert [111].

4.1.2.1 ISCOMs und andere kolloidale Strukturen mit Quil A

Der Begriff ISCOM stammt vom englischen Begriff *immunostimulating complex* und wurde von Morein et al. erstmals eingeführt [15]. Morein et al. beschreiben sie als

ca. 35 nm große, käfigartige Struktur, die aus ringförmigen Untereinheiten mit einem Durchmesser von etwa 12 nm aufgebaut ist. Diese Aggregate steigerten die Immunantwort im Vergleich zu mizellaren Systemen mindestens um den Faktor 10 [15]. Gebildet werden ISCOMs vom pseudoternären System Phospholipid, Cholesterol und Quil A zusammen mit einem adsorbierten oder integrierten Antigen. Auch einige isolierte Saponine des Quil A wie z.B. QS-7, QS-18 und QS-21 können mit den anderen Stoffen ISCOMs bilden [90]. Enthalten die ISCOMs kein Antigen, werden sie als ISCOM-Matrix oder leeres ISCOM bezeichnet [90].

Die ISCOMs transportieren die Antigene in das Cytosol von zur Antigenpräsentation befähigten Zellen. Von dort gelangen sie in das endoplasmatische Retikulum (ER). Im ER werden sie an antigenpräsentierende Proteine gebunden und zur Zelloberfläche transportiert [112]. Es ist zwar anzunehmen, dass die Toxizität der Saponine in den ISCOMs geringer ist, die vorliegenden Studien ergeben jedoch ein heterogenes Bild [92].

Die ISCOMs werden über hydrophobe, sterische Wechselwirkungen und wahrscheinlich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Bestandteilen zusammengehalten [17]. Dabei sind die zwei Bestandteile Saponin und Cholesterol essentiell [103]. Andere Studien zeigen, dass für die Bildung der ISCOMs zusätzlich ein Phospholipid benötigt wird [17, 113]. Dieser Widerspruch ist mit der Herstellmethode über die Dialyse eines zusammen mit Quil A für die Solubilisation des Cholesterols eingesetzten Emulgators zu erklären. Rückstände des Emulgators können analog den Phospholipiden die Bildung der ISCOMs bewirken [114].

Eine neue Studie zeigt, dass Cholesterol durch das kationische DC-Chol (3β -[N-(N',N'-Dimethylaminoethan)-carbamoyl]-cholesterol) ersetzt werden kann. Das Ergebnis sind ISCOMs mit einem stark positiven Zetapotential. Die Autoren erhoffen sich, dass die Anlagerung häufig negativ geladener Proteine und DNA-Untereinheiten als Antigene dadurch erleichtert wird [115]. Im Gegensatz dazu ließ sich keine ausreichende Menge an DOTAP (Dioleoyl-trimethyl-ammonium-propan) als Ersatz für das Phospholipid inkorporieren, um ein positives Zetapotential zu erreichen [116].

Um den Einfluss der Zusammensetzung auf die gebildeten Strukturen zu finden, stellten Demana et al. ein pseudoternäres Mischungs-dreieck auf (Abb.: 4.1) [18]. Für die Herstellung wurde die Hydratation eines Lipidfilms eingesetzt, die die Abwesenheit weiterer Emulgatoren in der Formulierung garantiert [113]. Die Verwendung einer pseudobinären Mischung führt, wie bereits zuvor beschrieben, zur Bildung von *wormlike micelles*. Dabei kristallisiert bei einem Verhältnis von mehr als 1:9 (Cholesterol : Quil A) überschüssiges Cholesterol aus [18]. Ein geringer Anteil

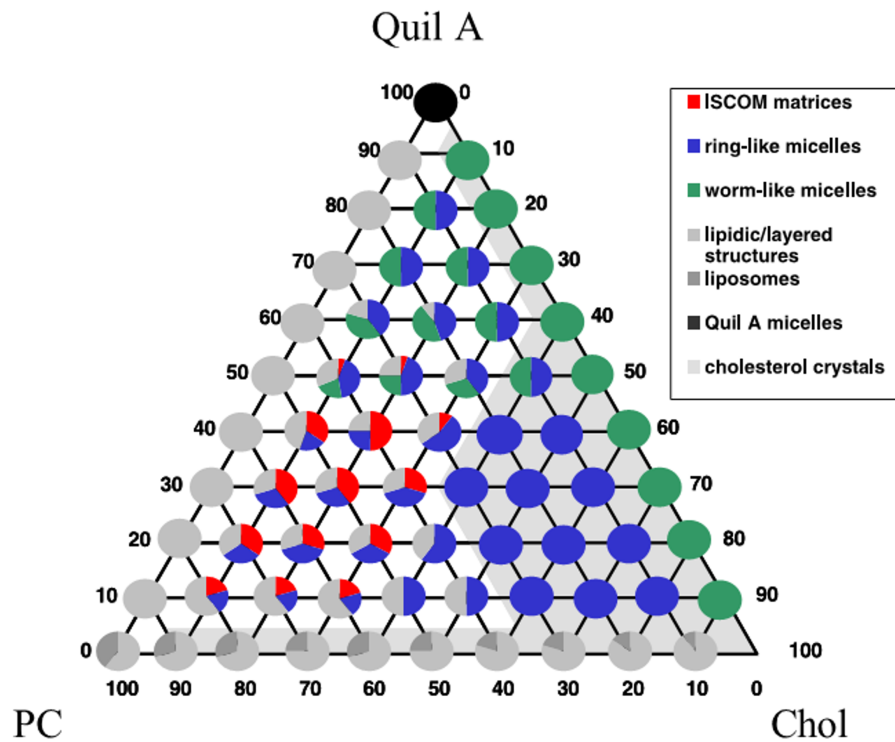


Abb. 4.1: Pseudoternäres Mischungsdiagramm für Formulierungen von Quil A, Cholesterol und Phosphatidylcholin in TRIS-Puffer (140mM, pH 7,4) (1 Tag nach Herstellung) [18].

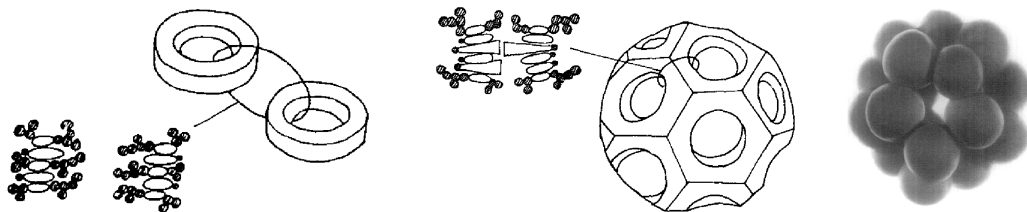


Abb. 4.2: Aufbau von links: *ringlike micelles* und ISCOMs nach Kersten et al. [17]; rechts: ISCOMs nach Özel et al. [16].

von Phospholipid führt zur Bildung einer helicalen Überstruktur der *wormlike micelles* [18]. Derartige helicale Überstrukturen der *wormlike micelles* werden auch von anderen Autoren beobachtet [115, 17]. Lediglich die pseudoternären Mischungen zeigten die Bildung von ISCOM-Matrices. Weitere Strukturen in den pseudoternären Mischungen sind: Liposomen, *ringlike micelles* und lamellare Strukturen. Eine Lagerung der Formulierungen über einen Monat bewirkt eine Verschiebung des Gleichgewichtes zugunsten der ISCOM-Matrices. Lediglich die *wormlike micelles* der pseudobinären Mischungen aus Quil A und Cholesterol zeigen keine weitere Veränderung bei Lagerung. Daraus wurde geschlossen, dass *ringlike micelles* Vorstufen der ISCOM-Matrices darstellen [18].

Auf der Basis von elektronenmikroskopischen Aufnahmen stellen Kersten et al. Strukturvorstellungen der unterschiedlichen Aggregate vor. Sie gehen von *ringlike micelles* als Grundstruktur aus [17]. Im Gegensatz dazu erklären Özel et al. die Struktur der ISCOMs durch eine Zusammenlagerung von ca. 20 sphärischen Mizellen, auch hier diene die Elektronenmikroskopie als Grundlage (Abb.: 4.2) [16].

4.2 Material und Methoden

Die in diesem Teil der Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Timo Paepenmüller erarbeitet, dessen Promotionsprojekt schwerpunktmäßig der physikalisch-chemischen Charakterisierung der ISCOMs gewidmet ist. Der Focus der vorliegenden Arbeit hingegen liegt auf Streuexperimenten an den *wormlike micelles*.

4.2.1 Material

Quil A

Quil A ist ein Saponingemisch, das aus *Quillaja saponaria* molina über eine wässrige Extraktion gewonnen wird. Der Rohextrakt wird weiter aufgereinigt und gefriergetrocknet. Das erhaltene Pulver stellt Quil A dar.

In dieser Arbeit wurde Quil A in zwei unterschiedlichen Qualitäten eingesetzt:

- QA (Accurate Chemical, USA, Westbury)
- XQA (Isconova AB, Schweden, Uppsala)

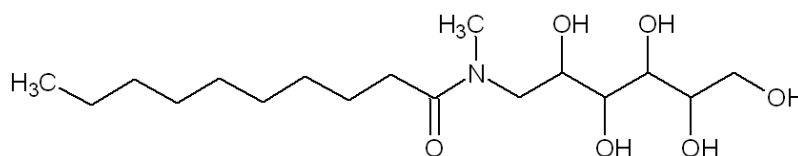
wobei XQA ein stärker aufgereinigter Extrakt ist.

Im Folgenden bezeichnet Quil A den Oberbegriff der unterschiedlichen Extrakte, während QA und XQA für die beiden unterschiedlichen Quil A-Qualitäten stehen. QS-21 stellt einen der vier Hauptbestandteile des Quil A (s. Tab.: 4.1) und wird für die Strukturuntersuchungen als Modells substanz angesehen.

Es wurden unterschiedliche Chargen von QA eingesetzt. Tabelle 4.2 zeigt die in der Arbeit verwendete Bezeichnung für die entsprechende Charge des Herstellers. Wenn es im Text nicht anders erwähnt ist, wurde Charge B eingesetzt.

Tab. 4.2: Bezeichnung der eingesetzten QA-Charge, sowie die jeweiligen Herstell- und Mindesthaltbarkeitsdaten.

Arbeit	Hersteller	Herstelldatum	Mindesthaltbarkeit
A	L77-222	28.10.2002	Okt. 2007
B	L77-238	03.02.2005	Feb. 2010

**Abb. 4.3:** Strukturformel von Mega-10.

Cholesterol (Chol)

Abbildung 4.38 zeigt die Struktur von Cholesterol. Cholesterol weist aufgrund der Hydroxygruppe zwar eine Amphiphilie auf, ist als W/O-Emulgator jedoch nicht in der Lage, wässrige Mizellen zu bilden. In Wasser ist es praktisch unlöslich (Sättigungskonzentration: ca. 0,02 µg/ml [117]).

Das in dieser Arbeit verwendete Cholesterol wurde von Sigma-Aldrich (Deutschland, Taufkirchen) bezogen.

Cholesterolderivate

Um Aussagen über den Einfluss unterschiedlicher Cholesterolderivate auf die gebildeten Assoziate zu machen, wurden Dihydrocholesterol (DHC, Sigma-Aldrich, Deutschland, Steinheim), Ergosterol (Ergo, Fluka, Schweiz, Buchs) und 5α-Cholestan (Fluka, Schweiz, Buchs) eingesetzt. Die entsprechenden Strukturformeln sind in Abbildung 4.38 dargestellt.

Phosphatidylcholin

Das in der Arbeit eingesetzte Phosphatidylcholin war Phospholipon 100 (P100, Phospholipid GmbH, Deutschland, Köln). Phospholipon 100 ist eine alte Bezeichnung des Herstellers für das in Abschnitt 3.2.1 näher beschriebene Phospholipon 90G und entspricht diesem in der Zusammensetzung und den Eigenschaften.

Auch in diesem Kapitel wird anstelle von Phosphatidylcholin der Begriff Lecithin verwendet.

N-Decanoyl-N-methylglucamid

Mega-10 (N-Decanoyl-N-methylglucamid, Fluka, Schweiz, Buchs) ist ein nichtionischer, hydrophiler Emulgator (Abb.: 4.3).

Sonstige Substanzen

Die meisten Systeme wurden in gepufferten, wässrigen Lösungsmitteln hergestellt. Als Puffer diente Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS, Merck KGaA, Deutschland, Darmstadt). Wasser wurde ausschließlich in bidestillierter Qualität eingesetzt. Für die SANS Messungen wurde Wasser durch Deuteriumoxid (Deutero GmbH, Deutschland, Kastellaun) ersetzt.

Für die Negativkontrastierung wurde Phosphorwolframsäure (Sigma-Aldrich, Deutschland, Taufkirchen) als Kontrastmittel eingesetzt.

4.2.2 Methoden

4.2.2.1 Herstellung der Systeme

Sämtliche Quil A-Systeme sind im wässrigem Milieu instabil (s. Abschnitt: 4.1.2). Aus diesem Grund wurden die Systeme direkt nach Herstellung bis zu ihrer Charakterisierung bei -20 °C gelagert.

QA / XQA - Mizellen

6,7 mg/ml QA bzw. XQA wurden in TRIS-Puffer (140mM, pH 7,4) gelöst. Als Lösungsmittel diente Wasser oder Deuteriumoxid.

Pseudobinäre Systeme (Chol/Quil A) mittels Filmmethode

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Formulierungen mittels Filmmethode hergestellt.

Die Filmmethode für die Herstellung von ISCOMs wurde erstmals von Copland et al. beschrieben [113]. Cholesterol wurde in Glasvials eingewogen und in Chloroform gelöst. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum bei Raumtemperatur entfernt und der entstandene Film in einer zuvor hergestellten QA bzw. XQA-Lösung in TRIS-Puffer unter Rühren auf dem Magnetprüher über 24 h hydratisiert. Im Anschluss wurden die Proben durch einen 0,22 μm Membranfilter (PVDF-Filter, Millipore, USA, Billerica) filtriert.

Die Gesamtkonzentration der Bestandteile (Chol und Quil A) betrug 6,7 mg/ml, wobei sowohl QA, als auch XQA eingesetzt wurden.

Pseudobinäre Systeme (Chol/Quil A) mittels Dialyse

Lediglich in Abschnitt 4.3.4 wurden die Formulierungen mittels Dialyse hergestellt.

Cholesterol wurde abgewogen und in Chloroform gelöst, das im Anschluss unter Vakuum für 1 h bei Raumtemperatur abgedampft wurde. Der erhaltene Lipidfilm wurde in einer Lösung von QA und Mega-10 (100 mg/ml) in TRIS-Puffer (140mM, pH 7,4) solubilisiert. Die mizellare Lösung wurde für 5 h bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer gerührt. Im Anschluss wurde Mega-10 durch Dialyse über eine Dialysenmembran (Molecular Weight Cut-off 5000 Da, Spectra/Por, USA, Rancho Dominguez) entfernt. Die Dialyse wurde über 72 h unter Rühren bei 4 °C durchgeführt. Alle 12 h wurde 1 l TRIS-Puffer (140mM, pH 7,4) ersetzt.

Die Gesamtkonzentration der Bestandteile (Chol und QA) betrug 6,7 mg/ml.

Liposomen

Die Liposomen wurden ebenfalls nach der Filmmethode hergestellt. Zunächst wurde ein Film aus Cholesterol und Phospholipid durch Lösen in Chloroform und anschließende Entfernung des Lösungsmittels in Vakuum über 1 h bei Raumtemperatur hergestellt. Der resultierende Film wurde in bidestilliertem Wasser hydratisiert und im Anschluss mittels Ultraschall im SoniPrep 150 (MSE Scientific Instruments, England, Crawley) über 30 Zyklen mit 30 s Beschallen und 30 s Pause dispergiert. Die Gesamtlipidkonzentration betrug 50 mg/ml.

Ein Teil der so hergestellten Liposomen wurde unverändert vermessen. Des Weiteren wurde der Einfluss der Zugabe eines QA-Zusatzes untersucht: zu 1 ml der Liposomen wurden 125 μ l einer QA-Lösung in Wasser (20 mg/ml) pipettiert. Die erhaltene Mischung wurde direkt im Anschluss für 30 s bei 600 U/min mit dem MS1 Minishaker (IKA, Deutschland, Stauffen) gemischt.

4.2.2.2 Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS)

Die Messungen erfolgten mit einer Kratky-Kompaktkamera bei ca. 10^{-4} bar. Die Proben wurden mittels der Temperiereinheit K-Pr temperiert (beide: Anton Paar, Graz, Österreich). Die eingesetzte Röntgenstrahlung war Cu-K α -Strahlung mit einer Wellenlänge von $\lambda=0,1542$ nm, die vom Generator PW1830 mit der Röhre PW2253/11 (beide: Philips, Deutschland, Kassel) bei einer Spannung von 30 kV und einer Stromstärke von 20 mA erzeugt wurde. Die ebenfalls vorhandene K β -Strahlung wurde durch einen Nickelfilter vor dem Kollimationssystem reduziert. Die Detektion erfolgte mittels ortsempfindlichem Detektor (OED 50M, MBraun, München). Die Messzeit wurde um die Totzeit des Detektors korrigiert.

Vor der Messung wurden die Proben 10 min bei 25 °C temperiert. Im Anschluss erfolgten die Messungen über einen Zeitraum von 10.000 s.

Für die Entschmierung der Streukurven wurde das Programmpaket ITP-92 (Anton Paar, Graz, Österreich) eingesetzt. Die Entschmierung und die Berechnung der Elektronenabstandsfunktion (PDDF) erfolgte mittels inverser Fouriertransformation nach Glatter [25].

Einfluss des Lösungsmittels

Bei den SANS-Messungen wurde das Lösungsmittel Wasser gegen Deuteriumoxid ausgetauscht. Die physikochemischen Parameter der Lösungsmittel wie z.B. die Viskosität und die Oberflächenspannung variieren leicht, wodurch es zu einer Änderung der Strukturen kommen kann. Um eine Änderung der Systeme auszuschließen, wurden für SAXS entsprechende Formulierungen der Quil A-Mizellen mit Cholesterol in beiden Lösungsmitteln hergestellt. Die Form der Kurven, und damit der Aufbau der Mizellen, ist – im den SAXS-Messungen zugänglichen Messbereich – unabhängig vom verwendeten Lösungsmittel.

Lagerung der Formulierungen

Die Formulierungen konnten nicht immer direkt nach der Herstellung vermessen werden. Um den Zustand nach der Herstellung zu konservieren und eine Hydrolyse von Quil A zu verlangsamen, wurden sie nach der Herstellung sofort bei –20 °C gelagert und erst direkt vor der Untersuchung aufgetaut.

Um auszuschließen, dass der Einfrierprozeß selber, bzw. mehrfaches Auftauen und Einfrieren die Struktur der Formulierung verändert, wurden zusätzliche SAXS-Messungen durchgeführt. Dazu wurden die Streukurven der Formulierung direkt nach der Herstellung, nach einmaligem Einfrieren, nach fünf Auftau- und Einfrierzyklen sowie nach zwei Wochen Lagerung bei –20 °C aufgenommen. In keinem Fall ergab sich eine Änderung der Streukurve, so dass von einer unveränderten Struktur ausgegangen wird.

Zeitaufgelöste Messung der Liposomen

Die Proben wurden direkt nach Herstellung in die Kapillare gefüllt und im Anschluss 10 min temperiert. Es folgten regelmäßige Messungen im Abstand von etwa 2 h an der gleichen Probe, ohne dass sie erneut in die Kapillare eingefüllt wurde. Die Proben konnten mindestens über einen Zeitraum von 30 h untersucht werden.

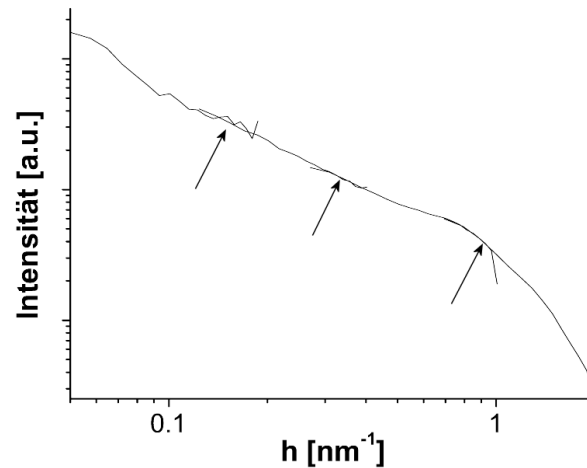


Abb. 4.4: Beispielhafte SANS Streukurve, die Pfeile markieren die messtechnisch bedingten Überlappungen.

Aufgrund der hohen Lipidkonzentration und der daraus resultierenden hohen Streuintensität konnte die Messzeit auf 5.000 s reduziert werden.

4.2.2.3 Neutronenkleinwinkelstreuung (SANS)

Die SANS Untersuchungen wurden am SANS1 am FRG1 Forschungsreaktor des GKSS Forschungszentrum (Deutschland, Geesthacht) durchgeführt. Die eingesetzte Wellenlänge der Neutronenstrahlung betrug 0,85 nm. Damit konnten die Streukurven im Bereich von $0,07 - 2,5 \text{ nm}^{-1}$ aufgenommen werden. Der Detektor wurde dabei in vier unterschiedlichen Entfernungen zur Probe positioniert (0,7 – 7 m). Die Proben wurden in 2 mm Quartzküvetten bei $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ vermessen.

Bedingt durch die vier Entfernungen des Detektors für die Messung ergibt sich eine Streukurve, die in einigen Teilen überlappt (s. Abbildung 4.4)

Ist die Konzentration der zu untersuchenden Lösung zu hoch, kommt es zu interpartikulären Interferenzen. Als Folge sinkt die Intensität der gemessenen Streukurve bei kleinen Winkeln. Dieser Effekt ist erst bei Konzentrationen über einer kritischen Konzentration (c^*) zu beobachten. Um auszuschließen, dass die Konzentration der hergestellten Proben größer als c^* ist, wurden einige der Proben auch verdünnt (1:1, 1:2 und 1:4) vermessen.

Ein Unterschied in den Streukurven war nicht zu erkennen, so dass für die Messungen die unverdünnten Systeme mit einer Gesamtlipid-Konzentration von 6,7 mg/ml eingesetzt wurden.

4.2.2.4 Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS)

Der hydrodynamische Durchmesser der Quil A Mizellen wurde mit dem Zetasizer Nano ZS (Malvern, Deutschland, Herrenberg) ausgerüstet mit einem 4 mW He/Ne Laser durchgeführt. Die Probe befand sich in Polycarbonat Küvetten (Sarstedt AG & Co, Deutschland, Nürnberg) und wurde mittels Rückstreuung (173°) bei 25°C dreimal vermessen. Die Auswertung der Daten erfolgte über einen CONTIN Algorithmus der Malvern DLS Software [118]. Als Partikelgröße wurde der kleinere Modalwert der resultierenden Intensitätsverteilung verwendet.

Für die Liposomen war eine Auswertung mittels *zAverage* möglich und dementsprechend wurde dieser ausgewertet.

4.2.2.5 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Für die TEM Aufnahmen wurden die Mizellen mittels Negativkontrastierung sichtbar gemacht. Als Kontrastmittel wurde Phosphorwolframsäure (2 % in Wasser pH 5,2) eingesetzt. Für die Aufnahmen wurden das Elektronenmikroskop EM 300 (Philips, Deutschland), sowie das LEO EM 922 EFTEM (Leo, Deutschland, Oberkochen) verwendet.

4.2.2.6 Cryo-TEM

Die Cryo-TEM Aufnahmen wurden mit dem Elektronenmikroskop EM 120 (Philips, Deutschland) ausgestattet mit einer Cryo-Einheit von Gatan (USA, Pleasanton) bei 120 kV aufgenommen.

4.2.2.7 Molecular Modelling

Eine Abschätzung der Größen von QS-21, sowie eine mögliche Zusammenlagerung von QS-21 und Chol, erfolgte mittels Molecular Modelling. Die Berechnungen wurden mit dem Programm HyperChem (Release 7.03, Hypercube, Inc., USA, Gainesville) durchgeführt. Für die Berechnungen wurde das Kraftfeld MM+ (Optionen: Bond dipoles, Cutoffs: none) nach einem Polak-Ribiere-Algorithmus eingesetzt. Als Abbruchkriterium diente ein RMS-gradient von unter $0,05 \frac{\text{kcal}}{\text{\AA mol}}$. Die Abbildungen wurden mit dem Programm UCSF Chimera der University of California (USA, San Francisco) erstellt.

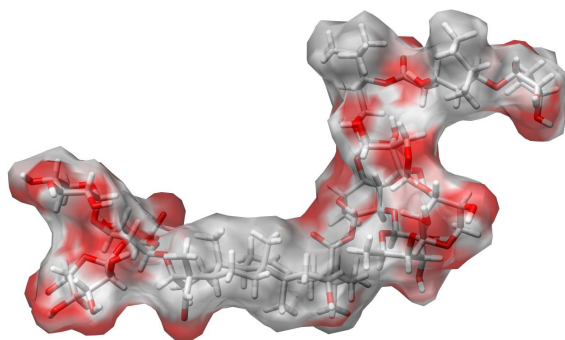


Abb. 4.5: 3D-Struktur eines QS-21 Moleküls in Vakuum durch Molecular Modelling. Hydrophile Bereiche sind rot, lipophile grau dargestellt.

4.3 Versuchsergebnisse und Diskussion

Quil A bildet zusammen mit Lecithin und Cholesterol unter bestimmten Voraussetzungen ISCOM-Matrices. Da über den Aufbau der ISCOM-Matrices bisher wenig bekannt ist, sollte in diesem Teil der Arbeit versucht werden, einen Einblick in die komplexe, käfigartige Struktur zu bekommen. Die Untersuchung der kompletten ISCOM-Matrix ist durch die Verwendung eines Naturstoffgemisches (Quil A) und das Vorliegen weiterer Strukturen wie Liposomen und *ringlike micelles* sehr komplex. Aus diesem Grund lag das Hauptaugenmerk in der vorliegenden Arbeit auf der Untersuchung der Mizellen aus Quil A, und der Änderung ihrer Struktur bei der Solubilisation von Cholesterol und Cholesterolderivaten. Nach Demana et al. kommt es hierbei ausschließlich zur Bildung von *wormlike micelles* [18]. Aber auch die komplexeren Strukturen, die sich in den pseudoternären Mischungen bilden können, wurden ansatzweise untersucht.

Zusätzlich wird untersucht, inwiefern sich unterschiedliche Verunreinigungen auf die Assoziate auswirken. Dazu wurde Quil A zweier Hersteller – QA (Accurate Chemical) und das stärker aufgereinigte XQA (Isconova) – eingesetzt.

4.3.1 Aufbau von Quil A-Mizellen

4.3.1.1 Molecular Modelling

Für das Molecular Modelling wurde die Molekülstruktur von QS-21, das hier als Modellschubstanz für Quil A dienen soll, im Vakuum berechnet (Strukturformel s. Tab. 4.1). Diese Struktur kann aufgrund des aufgereinigten Naturextraktes lediglich

Tab. 4.3: Größen von QS-21 in Vakuum bestimmt mittels Molecular Modelling.

Molekülteil	Richtung	Größe [nm]
komplett	Länge	3,2
	Breite	1,4
	Höhe	1,8
Triterpen	Länge	1,2
	Breite	0,7
	Höhe	0,6
Zucker an C3	Länge	0,8
	Breite	1,1
	Höhe	0,9
Zucker an C28	Länge	1,4
	Breite	1,4
	Höhe	1,6

Tab. 4.4: Größe von QA und XQA-Mizellen bestimmt mit PCS (n=3).

Quil A	Größe [nm]
QA	8,63±0,09
XQA	40,2±4,19

eine Modellschubstanz darstellen. Zusätzlich erfolgt in wässriger Lösung durch eine Umlagerung des Acylrestes eine Isomerisierung zu QS-21B, das im Gleichgewicht mit QS-21 vorliegt [101].

Abbildung 4.5 zeigt die erhaltene 3D-Struktur von QS-21. Aus der Molekülstruktur können Größen für die hydrophilen und lipophilen Bereiche des Moleküls abgeleitet werden (Tabelle 4.3).

4.3.1.2 PCS

Die Größe der Quil A-Mizellen ist stark abhängig von der Art des eingesetzten Quil A. Während QA-Mizellen 8,63 nm groß sind, sind XQA-Mizellen mit 40,2 nm wesentlich größer (s. Tab. 4.4). Zusätzlich können in allen Proben große Partikel beobachtet werden, wobei die exakte Größe dieses Modalwertes nicht reproduzierbar ist. Die großen Partikel machen eine Auswertung anhand von *zAverage* und PI unmöglich. Sie stammen möglicherweise von einem geringen Anteil ungelöster Verunreinigungen des Quil A.

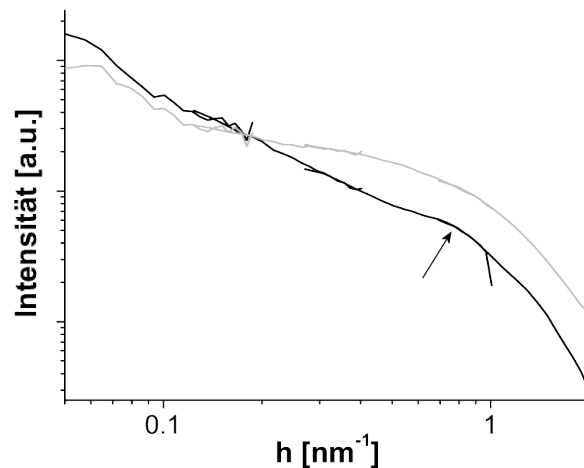


Abb. 4.6: log-log Darstellung der SANS-Streukurven von XQA (schwarz) und QA Mizellen (grau). Der Pfeil markiert den Reflex (s. Text).

4.3.1.3 SANS

Neutronenstreuung eignet sich gut, um Informationen über die Form und Größe von Mizellen zu erhalten. Um die Mizellen einer Messung mittels Neutronenstreuung zugänglich machen zu können, wurde Wasser als Lösungsmittel gegen Deuteriumoxid ausgetauscht.

SANS unterscheidet sich von SAXS, wie es in Kapitel 2.1 dargestellt wurde, lediglich in der Weise, dass hier eine Streuung nicht nur an Elektronen erfolgt. In den vorliegenden Messungen wurde der für Neutronenstrahlung große Kontrast zwischen Deuterium und Wasserstoffatomen ausgenutzt. Eine Mizelle in Deuteriumoxid-Umgebung wird hier also homogen dargestellt, obwohl sie eine inhomogene Elektrodendichte aufweist.

Die in Abbildung 4.6 dargestellten Streukurven zeigen deutlich, dass Assoziate vorliegen, wobei sich die Kurven von QA und XQA deutlich unterscheiden. Im Folgenden sollen die sich daraus ableitenden möglichen Formen der Mizellen diskutiert werden.

XQA-Mizellen

Die Assoziate mit XQA zeigen kein Guinierverhalten bei kleinen Winkeln, woraus abgeleitet werden kann, dass die Gesamtausdehnung der Partikel größer als die maximal bestimmbare Größe (45 nm) ist. Dies bestätigt die PCS Ergebnisse, die mit 40,2 nm als durchschnittliche Größe sehr große Partikel nachweisen.

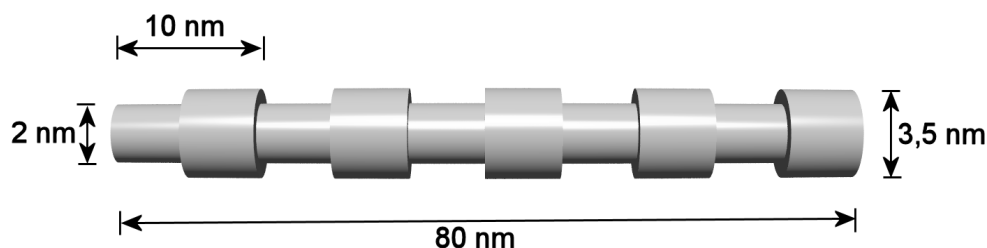


Abb. 4.7: Modellzylinder für die Berechnung der Beispielstreu­kurve des Modells der Inhomogenitäten entlang der Achse.

Zwischen $0,1 \text{ nm}^{-1}$ und $0,5 \text{ nm}^{-1}$ verhält sich die Intensität proportional zu ungefähr h^{-1} . Eine solche Proportionalität ist typisch für zylinderförmige Partikel. Dieser Aufbau der Mizellen kann leicht durch die Molekülstruktur von Quil A erklärt werden. Wie in Abbildung 4.5 zu sehen, ist das Grundgerüst ein ebenes, steifes Ringsystem, das an den Enden hydrophile Zuckerketten trägt. Diese Ringe können gut zu Zylindern gestapelt werden, dabei bilden die Ringe den lipophilen Kern, der von den beiden nach außen ragenden Zuckerketten, die die hydrophile Hülle bilden, stabilisiert wird. Ein derartiger Aufbau wird von Kersten et al. auch für die ISCOMs vorgeschlagen [17].

Bei größeren Winkeln kann im Fall homogener Zylinder eine stetige Änderung der Proportionalität von h^{-1} zu h^{-4} beobachtet werden. In diesem Bereich erhält man Informationen über den Zylinderquerschnitt. In der vorliegenden Kurve der XQA-Aggregate ist keine stetige Änderung der Proportionalität zu erkennen, denn der Kurve ist ein schwach ausgeprägter, breiter Reflex (s. Pfeil in Abbildung 4.6) aufgelagert. Durch diesen Reflex wird die Auswertung und die Anpassung von Modellkurven erschwert. Im Folgenden werden drei Möglichkeiten für die Bildung eines solchen Reflexes diskutiert.

Modell der Inhomogenitäten entlang der Achse

Bei diesem Modell ist relevant, dass es sich bei XQA um ein Naturstoffgemisch handelt. Da XQA ein hochgereinigtes Produkt ist, sollte es sich größtenteils um Variationen der Modells substanz QS-21 handeln, die sich im Wesentlichen in den Zuckerresten unterscheiden [92]. Unter der Voraussetzung, dass der Zylinder durch einen Stapel der Quil A-Moleküle gebildet wird, entspricht der Durchmesser des Zylinders ungefähr dem eines Kreises um das Quil A Molekül. Variieren die Zuckerreste, so ändert sich auch die Größe des Moleküls.

Derartige Änderungen des Durchmessers entlang der Achse des Zylinders können in der Bildung periodischer Strukturen – und damit der Bildung eines Reflexes im re-



Abb. 4.8: Schema des verdrillten Bandes

ziproken Raum – resultieren. Die Position des Reflexes ist gegeben durch $2\pi/d = h$ (d = periodischer Abstand der Inhomogenitäten) [19]. Leider ist eine mathematische Anpassung an ein solches Modell nicht möglich. Aus diesem Grund wurde die Annahme überprüft, indem die Streukurve des in Abbildung 4.7 dargestellten Modellzylinders mit Hilfe des Programms Singlebody MC (Version 11.2003) berechnet wurde (Abb.: 4.11 gestrichelt). Die in Abbildung 4.7 angegebenen Parameter wurden von den Werten des Molecular Modellings und von der Position des Reflexes abgeleitet.

Die Streukurven in Abbildung 4.11 sind im Holtzer-Plot ($h \cdot I(h)$ gegen h) dargestellt. Diese Darstellungsart wird häufig eingesetzt, um die Streukurve von Zylindern darzustellen, da eine Proportionalität zu h^{-1} einer Steigung von 0 im Holtzer Plot entspricht. Die Ausprägung eines zusätzlichen Reflexes ist im Holtzer-Plot deutlich zu erkennen. Der Abfall der simulierten Kurve ergibt sich aus der für die Simulation vorgegebenen maximalen Größe von 80 nm. Die Steigung der simulierten Kurve (Abb.: 4.11 gestrichelt) ist bei ca. $0,2 \text{ nm}^{-1}$ exakt 0, was einer Proportionalität zu h^{-1} entspricht, die Steigung der gemessenen Streukurve (Abb.: 4.11 grau) hingegen ist etwas größer. Dieser Unterschied könnte durch das Vorliegen flexibler *worm-like micelles* erklärt werden, denn die Proportionalität flexibler Zylinder nähert sich asymptotisch $h^{-1,67}$ [26].

Es stellt sich jedoch die Frage, was die Moleküle zur Ausbildung eines derartigen periodischen Aufbaus bewegen sollte, da immerhin ca. 10 Moleküle (ausgehend von den Größen des Molecular Modellings) am Aufbau einer Periode beteiligt sein müssten. Insofern erscheint dieses Modell wenig wahrscheinlich.

Modell eines verdrillten Bandes

Für ein C32-Alkan, das an beiden Enden einen hydrophilen Phosphocholinrest trägt, wurden in TEM- und Cryo-TEM-Aufnahmen helicale Strukturen beobachtet. Die Bildung dieser helicalen Strukturen wird durch die voluminösen hydrophilen Reste dieses Bolaamphiphils begründet. Diese verhindern, dass sich die Moleküle parallel zueinander anordnen können, und erzwingen, dass sich das nächste Molekül leicht verdreht anlagert [119, 120, 121]. Das Resultat ist eine helicale Struktur, die einer Art

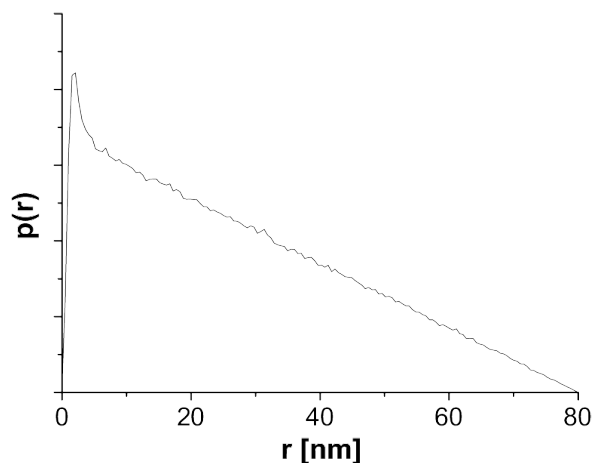


Abb. 4.9: Ergebnis der Simulation des verdrehten Bandes (PDDF).

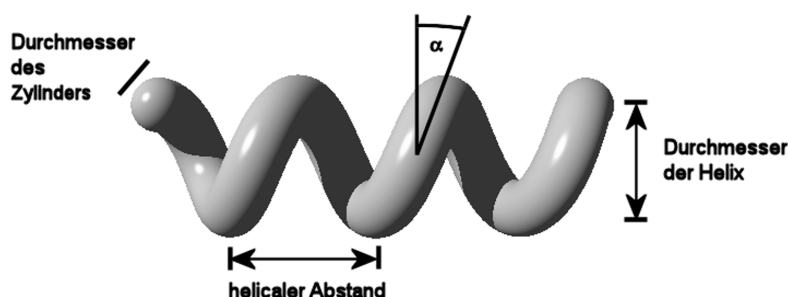


Abb. 4.10: Modell einer Helix mit den zugehörigen Parametern (α = Neigungswinkel).

verdrehtem Band ähnelt (Abb.: 4.8). Ein derartiger Aufbau ist auch im vorliegenden Fall denkbar.

Um dieses Modell zu überprüfen, wurde die PDDF und daraus folgend die Streukurve mit einem selbstgeschriebenen MATLAB-Programm berechnet. Die Querschnittsfläche des verdrehten Bandes wurde als elliptisch angesehen. Die Parameter der Ellipse wurden von den Größen des QS-21-Moleküls abgeleitet, das eine Querschnittsfläche von $1,4 \times 3,2$ nm aufweist (s. 4.3.1.1). Für den helicalen Abstand wurde der doppelte Wert des helicalen Fits eingesetzt (31,2 nm, s. helicales Modell), da es sich bei diesem Modell um eine Doppelhelix handelt. Die Länge betrug 80 nm.

In Abbildung 4.9 ist das Ergebnis der Simulation dargestellt. Es ist eindeutig zu erkennen, dass keine ausreichende Periodizität für die Bildung eines Reflexes im normalen oder im reziproken Raum vorliegt. Verändert man die Parameter, so ist ein Reflex erst bei einer wesentlich größeren Anisotropie der Querschnittsfläche ($1,40 \times 14$ nm) nachzuweisen, so dass dieses Modell als Ursache für die Bildung des Reflexes ausscheidet.

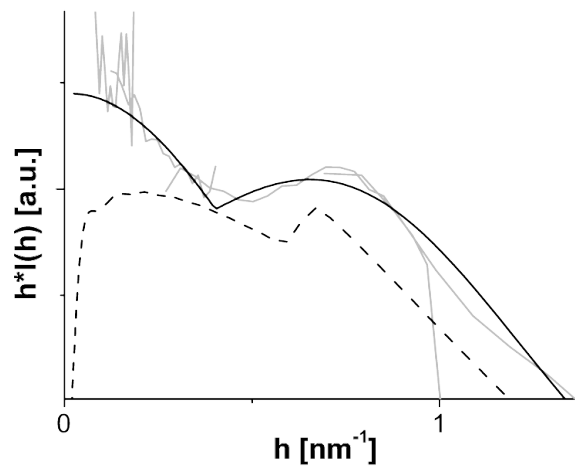


Abb. 4.11: Holtzer Darstellung der XQA-Streukurve (grau) und der angepassten helicalen Streukurve (schwarz) sowie der berechneten Modellkurve eines inhomogenen Zylinders entlang der Achse (schwarz - gestrichelt).

Helicales Modell

Eine weitere Möglichkeit, die zur Bildung periodischer Strukturen führt, kann aus den TEM-Aufnahmen von QA nach der Solubilisation von Cholesterol abgeleitet werden. Dort wird die Bildung von *wormlike micelles* mit einer helicalen Überstruktur gezeigt (s. Abschnitt 4.3.2.3). Abbildung 4.10 zeigt ein Modell der Struktur. Leider weisen die Mizellen ohne Cholesterol keinen ausreichenden Kontrast auf, um mit dieser Methode nachgewiesen werden zu können. Die Möglichkeit einer solchen helicalen Überstruktur ist aber dennoch in Betracht zu ziehen.

Die Streukurve einer Helix wurde mathematisch von Lebedev et al. beschrieben. Sie wird durch zwei Beiträge charakterisiert [122]:

- die Streuung eines länglichen Partikels
- und die Periodizität der Helix.

Eine Periodizität führt wie in Abschnitt 2.2 beschrieben zur Ausbildung eines Reflexes in den Streukurven, wobei die Position des Reflexes hier abhängig ist vom Durchmesser und dem helicalen Abstand der Helix.

Ein Fit der Messdaten an das nicht vereinfachte Modell für helicale Abstände über 10 nm liefert dabei gute Ergebnisse und ist in Abbildung 4.11 (schwarze Kurve) in der Holtzer-Darstellung dargestellt. Tabelle 4.5 zeigt die erhaltenen Parameter. Im verwendeten helicalen Modell von Lebedev et al. bilden aneinandergereihte Kugeln das Rückgrat der Helix. Der Durchmesser der Kugeln (D) ist mit 3,82 nm im Vergleich zur Größe eines QS-21 Moleküls (s. Tabelle 4.3) verhältnismäßig groß.

Tab. 4.5: Links: Parameter der XQA-Mizellen nach Anpassung des helicalen Modells von Lebedev et al. mit dem Fehler des Fits [122]. Rechts: Modell der berechneten Helix.

Parameter	Größe [nm]
Durchmesser der Kugeln	$3,82 \pm 0,02$
Durchmesser des Zylinders	$3,00 \pm 0,02$
helicaler Abstand	$15,6 \pm 0,2$
Durchmesser der Helix	$2,80 \pm 0,07$

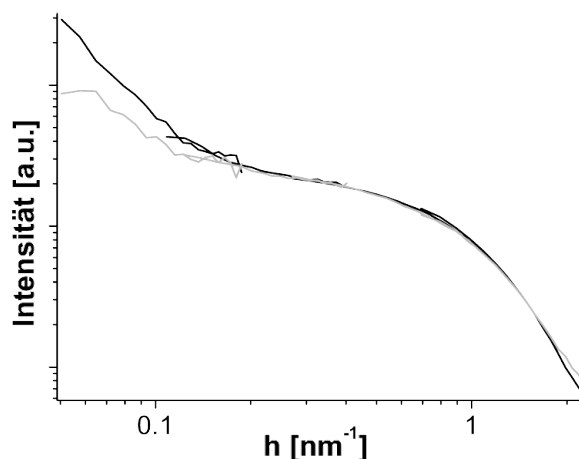
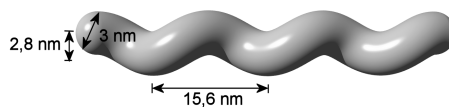


Abb. 4.12: Vergleich der SANS-Kurven unterschiedlicher QA-Chargen (Schwarz: Charge A; Grau: Charge B).

Der Durchmesser des Rückgrats sollte sich jedoch aus dem umgebenden Kreis um das QS-21 Molekül, also zwischen 1,4–3,2 nm, ergeben. Durch die Verwendung von Kugeln als Streuobjekte variiert die Dicke des Zylinders entlang seiner Achse. Der tatsächliche mittlere Durchmesser (d) ist dementsprechend kleiner und kann mit $d = D\pi/4$ berechnet werden. Es ergibt sich ein Durchmesser von 3,00 nm.

Der bestimmte helicale Abstand entspricht mit 15,6 nm in etwa dem Abstand der cholesterolhaltigen Systeme (s. 4.3.2.3). Dagegen ist der Durchmesser der Helix wesentlich geringer. Dieser Unterschied könnte jedoch durch das fehlende Cholesterol und die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden erklärt werden.

QA-Mizellen

Die Streukurven der QA-Mizellen unterscheiden sich deutlich von denen der XQA-Mizellen (Abb.: 4.6). Bei mittleren Winkeln scheint die Kurve ein Guinierverhalten aufzuweisen, was für eine vollständige Erfassung der Partikel spricht. Die Mizellen sind also – analog den PCS-Daten – kürzer als die XQA-Mizellen.

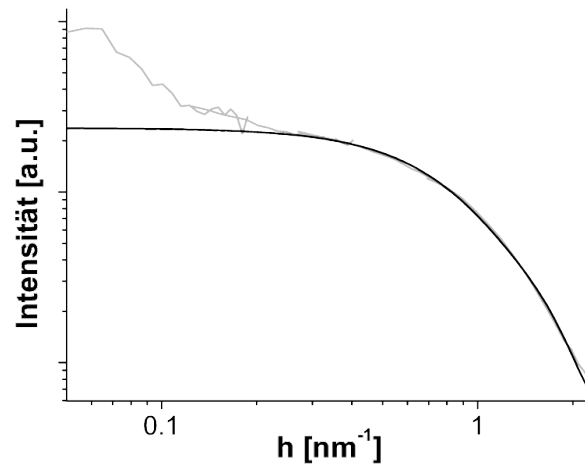


Abb. 4.13: Fit eines homogenen Zylinders (schwarz) an die Streukurve von QA (grau).

Tab. 4.6: Parameter aus dem zylindrischen Fit der QA-Mizellen mit dem Fehler des Fits (SANS)

Parameter	Größe [nm]
Durchmesser des Zylinders	$2,76 \pm 0,07$
Länge	$6,3 \pm 0,3$

Bei kleinen Winkeln steigt die Intensität jedoch wieder an. Wie stark dieser Anstieg ausgeprägt ist, ist abhängig von der verwendeten Charge (Abb.: 4.12). Es wird davon ausgegangen, dass der Anstieg durch die mittels PCS beobachteten ungelösten Verunreinigungen hervorgerufen wird und nicht der Streuung durch die Mizellen selber zuzuordnen ist.

Des Weiteren ist bei den vorliegenden Kurven kein zusätzlicher Reflex, der für das Vorliegen einer helicalen Struktur sprechen würde, nachzuweisen. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da für den Nachweis einer derartigen periodischen Struktur die Helix eine ausreichende Länge aufweisen muss.

Aufgrund der beschriebenen Annahmen wurde eine mathematische Anpassung an einen homogenen Zylinder durchgeführt [123]. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.13 und Tabelle 4.6 dargestellt.

Die Tatsache, dass die QA-Mizellen wesentlich kürzer sind als die XQA-Mizellen, steht im Einklang mit den PCS-Ergebnissen. Dabei ist die Länge mit 6,3 nm kürzer als die mittels PCS ermittelte Größe. Diese Differenz kann durch die unterschiedlichen Messmethoden begründet werden. PCS liefert den hydrodynamischen Durchmesser, während SANS den Kontrast zwischen Wasserstoff- und Deuterium – also der Mizelle selber – auflöst.



Abb. 4.14: schematische Darstellung des Kettenabbruchs durch Verunreinigungen in QA.

Der Durchmesser des Zylinders passt sehr gut zu den Molekülgrößen, wie sie beim Molecular Modelling erhalten wurden.

Es stellt sich die Frage, wieso die Mizellen aus QA kleiner sind als die des XQA. XQA ist stärker aufgereinigt als QA. Dementsprechend ist der Anteil lipophiler und amphiphiler Verunreinigungen in QA größer. Die vorliegenden Mizellen bestehen wahrscheinlich aus Stapeln von Quil A-Molekülen. Diese Stapel weisen dementsprechend im Bereich des Triterpens eine lipophile Fläche auf, die mit der wässrigen Phase in Kontakt treten muss. Hier können sich lipophile und amphiphile Verunreinigungen anlagern. Damit ist ein weiteres Stapeln der Quil A-Moleküle nicht mehr möglich, die Kette bricht ab. Der höhere Grad an Verunreinigungen im QA führt also zu einer Verkürzung der Mizelllänge (Abb.: 4.14).

4.3.1.4 SAXS

Um zusätzliche Informationen über den Aufbau innerhalb der Mizellen zu bekommen, wurde Röntgenkleinwinkelstreuung eingesetzt. Da die Intensitäten der Kratky-Messungen nicht auf absolute Einheiten normiert sind, wurden sie skaliert, um besser mit den SANS-Daten verglichen werden zu können.

XQA-Mizellen

Die entschluschten SAXS-Daten sind in Abbildung 4.15 im Vergleich zu den SANS-Kurven dargestellt. Es sind deutliche Unterschiede zu erkennen. Gemeinsam haben die Kurven, dass die Partikel nicht als Ganzes aufgelöst werden können. Aufgrund des für die ITP benötigten maximalen Durchmessers wird bei der Entschlusung der SAXS-Daten bei kleinen Winkeln ein Guinierverhalten erzwungen, was die geringere Steigung erklärt.

Bei großen Winkeln ist ein schwach ausgeprägtes Minimum bei ca. $1,6 \text{ nm}^{-1}$ zu erkennen, das auf den inhomogenen Aufbau der Mizellen zurückzuführen ist (hydrophile Hülle - lipophiler Kern). Des Weiteren ist die Intensität in diesem Bereich

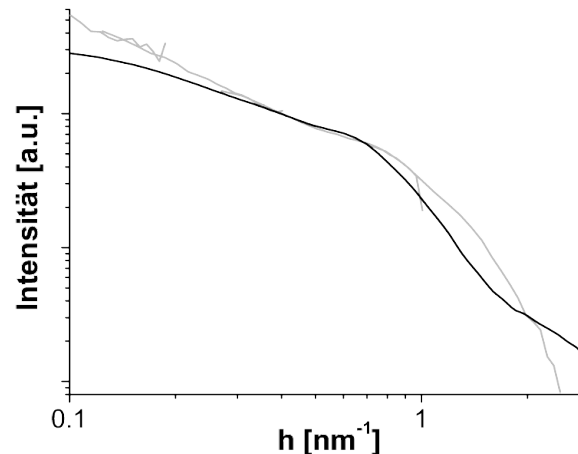


Abb. 4.15: XQA-Streukurven ermittelt mittels SAXS (schwarz) und SANS (grau).

gegenüber der SANS-Kurve geringer, was auf einen größeren Durchmesser des Querschnittes hinweist. Die Messungen wurden an derselben Probe durchgeführt, so dass der Unterschied nicht auf Probenvariationen zurückgeführt werden kann. Er muss also im Unterschied des Kontrastes zu suchen sein. Eine wahrscheinliche Erklärung ist die Hydratisierung der Zuckerketten des Quil A durch Deuteriumoxid. Dies führt zu einer Abschwächung des Kontrastes der Hülle für SANS nicht aber für SAXS. Ein solcher Effekt ist analog für eine SANS und SAXS-Studie an Mizellen aus Zuckerlipiden beschrieben [124].

Analog zu den SANS-Daten ist bei den SAXS-Kurven ein schwach ausgeprägter Reflex bei mittleren Winkeln zu erkennen, der auf eine Überstruktur der *wormlike micelles* schließen lässt. Für die SAXS-Kurven ist jedoch ein Fit an das helicale, analytische Modell nicht möglich, da dieses lediglich für homogene Helices eingesetzt werden kann.

Auffällig ist, dass der Reflex bei etwas kleineren Winkeln zu finden ist als bei den SANS-Kurven. Der Grund ist nicht bekannt. Als Ursache können zwei Möglichkeiten diskutiert werden:

- Die durch den inhomogenen Querschnitt veränderte Streukurve bei großen Winkeln – der der Reflex aufgelagert ist – „verschiebt“ den Reflex zu kleineren Winkeln.
- Eine Verschiebung des Reflexes als Artefakt aufgrund der Entschmierung mittels ITP.

Die zweite Möglichkeit gilt grundsätzlich immer. Die erste ist wenig wahrscheinlich, da auch in der PDDF, die der entschmierten Kurve entspricht, eine Verschiebung

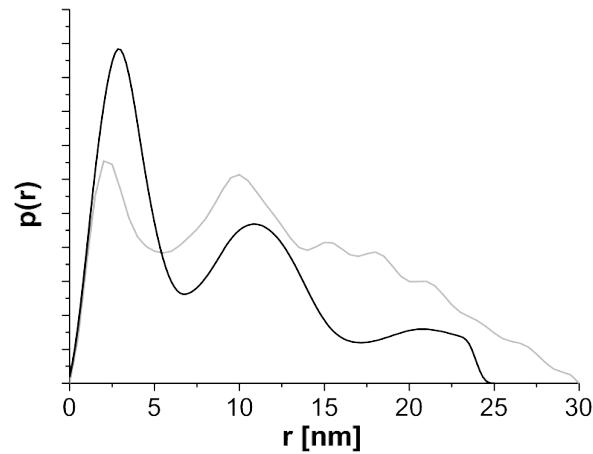


Abb. 4.16: PDDF der XQA-Mizellen nach Messung mit SAXS (schwarz) und SANS (grau) (Auswertung gemäß Kugelsymmetrie).

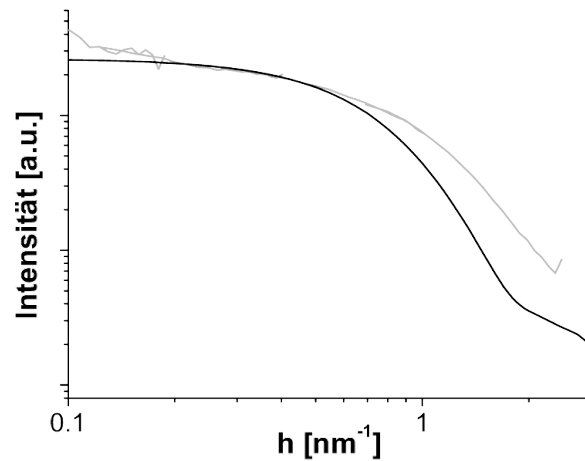


Abb. 4.17: QA-Streukurven gemessen mittels SAXS (nach der Entschmierung; schwarz) und SANS (grau).

des Maximums zu größeren r zu beobachten ist (Abbildung 4.16). Aufgrund der fehlenden Möglichkeit eines analytischen Fits kann eine abschließende Beurteilung jedoch nicht erfolgen.

QA-Mizellen

Abbildung 4.17 zeigt die Streukurven der QA-Mizellen gemessen mittels SAXS und SANS im Vergleich. Bei kleinen Winkeln ist mittels SAXS deutlich ein Guinierverhalten zu erkennen, während die SANS-Kurve wieder ansteigt. Dieser Anstieg befindet sich nicht im Messbereich der Kratky-Kamera, und kann dementsprechend mittels SAXS nicht mehr aufgelöst werden.

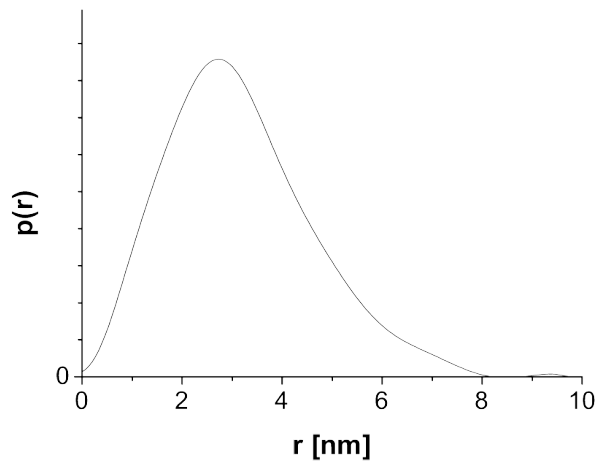


Abb. 4.18: PDDF der QA-Mizellen mittels SAXS (Auswertung gemäß Kugelsymmetrie).

Tab. 4.7: Ergebnisse der QA-Mizellen bestimmt mit SAXS.

Parameter	inhomogener Fit [nm]
Durchmesser des Zylinder	3,72
Durchmesser des lipophilen Kerns	2,96
Länge	8,2

Bereits im Abschnitt 4.3.1.3 wurde diskutiert, dass die Verunreinigungen des QA im Vergleich zum XQA eine Verkürzung der Assoziate bewirken. Diese Verkürzung ist auch hier deutlich an den Streukurven zu erkennen. Aus der zugehörigen PDDF kann die Länge der Aggregate aus dem Nulldurchgang mit 8,2 nm bestimmt werden (Abb.: 4.18).

Bei großen Winkeln, die Aussagen über den Querschnitt des Zylinders machen, weicht die SAXS-Kurve ebenfalls von der SANS-Kurve ab. Dies ist auf einen unterschiedlichen Querschnitt zurückzuführen. Wie bereits bei den XQA-Mizellen beschrieben, erklärt sich der Unterschied im Querschnitt durch den inhomogenen Aufbau der Mizellen in Bezug auf die SAXS-Messungen. Um Informationen über den Querschnitt zu erhalten, wurde die entschmierte Streukurve dementsprechend einem inhomogenen Zylinderfit unterworfen [123]. Die Länge des Zylinders wurde dabei nicht mitgefittet, da diese Information durch die Verwendung von D_{max} bei der ITP bereits enthalten ist. Das Ergebnis ist in Tabelle 4.7 dargestellt. Wie bereits bei den XQA-Kurven ist der Durchmesser – bestimmt man ihn mittels SAXS – größer als mittels SANS (2,76 nm), was auf den unterschiedlichen Kontrast zurückzuführen ist. Da der hydrophile Teil bei den SAXS-Messungen voluminöser gemessen wird,

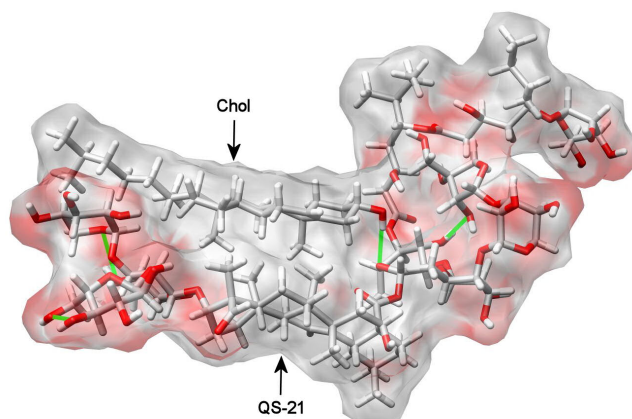


Abb. 4.19: Zusammenlagerung von QS-21 und Chol berechnet durch Molecular Modelling. Hydrophile Bereiche sind rot, lipophile grau und Wasserstoffbrückenbindungen grün dargestellt.

erklärt sich daraus auch die größere Länge im Vergleich zu den SANS-Messungen (6,3 nm).

Auch SAXS kann keine helicale Überstruktur der QA-Mizellen zeigen.

4.3.2 Solubilisation von Cholesterol

In diesem Abschnitt soll der Einfluss von Cholesterol auf die Quil A-Mizellen untersucht werden. Die Solubilisation von Cholesterol führt nach Demana et al. zur Ausbildung von *wormlike micelles* [18].

Fast alle Formulierungen wurden mittels Filmmethode hergestellt. Lediglich in Abschnitt 4.3.4 kam die Dialysemethode zum Einsatz.

4.3.2.1 Molecular Modelling

In diesem Abschnitt wird versucht, eine mögliche Anlagerung von Chol an QS-21 zu berechnen. Dabei ist es wichtig zu erwähnen, dass das verwendete Modell sehr stark von der Wirklichkeit abweichen kann, da die Zusammenlagerung nicht in Wasser berechnet wurde und QS-21 lediglich als Modells substanz für das in den Versuchen tatsächlich vorliegende Naturstoffgemisch dient. Des Weiteren müssen für die Berechnung der Anlagerung die Moleküle bereits im Vorfeld so positioniert werden, dass eine Anlagerung zumindest theoretisch möglich ist. Der Berechnung liegt also bereits eine Modellvorstellung zugrunde.

In Abbildung 4.19 ist zu erkennen, dass sich die beiden Moleküle Chol und QS-21 aufgrund der voluminösen Methylreste nicht parallel zu den Ringgerüsten stapeln

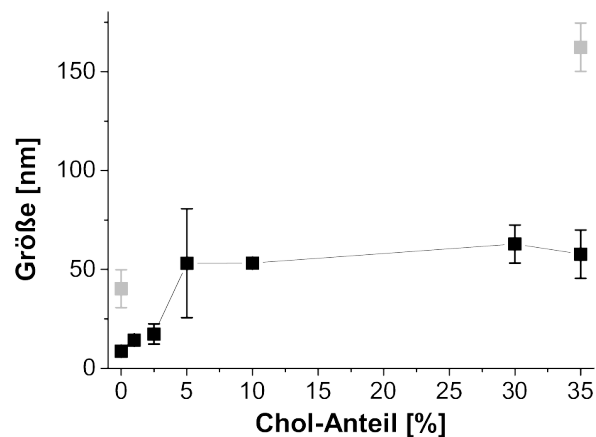


Abb. 4.20: Größe der Mizellen in Abhängigkeit vom Cholesterolgehalt der XQA (grau) und QA (schwarz) ($n=3$).

können, sondern einen Neigungswinkel von ca. 35° aufweisen. Die Hydroxylgruppe des Chol kann eine Wasserstoffbrückenbindung zur Fucose des QS-21 ausbilden. Diese könnte, neben der lipophilen Wechselwirkung der Ringe, für die Stabilisierung des Komplexes mitverantwortlich sein. Des Weiteren sitzen die Moleküle nicht direkt übereinander, sondern sind leicht gegeneinander verschoben.

4.3.2.2 PCS

Da – wie bereits bei den Chol-freien Quil A-Mizellen beschrieben (s. 4.3.1.2) – in der Intensitätsgewichtung noch ein weiterer Peak bei großen Partikelgrößen nachgewiesen wird, ist eine Auswertung mittels *zAverage* und PI nicht möglich. Dementsprechend kann im vorliegenden Fall keine Aussage über die Anisometrie der Mizellen gemacht werden. Auch hier wird vermutet, dass der zusätzliche Peak von ungelösten Verunreinigungen des Quil A stammt.

In Abbildung 4.20 ist deutlich zu erkennen, dass eine Solubilisierung von Cholesterol in einer Vergrößerung sowohl der QA als auch der XQA Mizellen resultiert. Bei den QA-Mizellen wird deutlich, dass bereits ein kleiner Zusatz von Chol zu einem Wachstum der Mizellen führt, und eine Erhöhung des Anteils über 5% keine deutliche Partikelvergrößerung mehr bewirkt. Des Weiteren sind die QA-Mizellen wesentlich kleiner als die XQA-Mizellen.

Da von XQA lediglich wenig Substanz vorlag, wurde hier keine komplette Konzentrationsreihe, sondern lediglich 0% und 35% Chol untersucht.

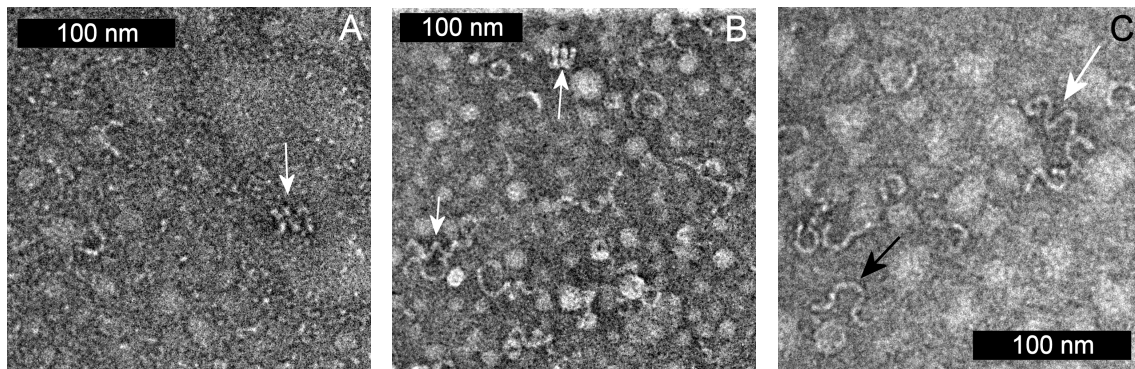


Abb. 4.21: TEM-Aufnahmen nach Negativkontrastierung von QA-Mizellen mit unterschiedlichem Anteil an Chol (A: 1 %; B: 5 % C: 35 %). Die weißen Pfeile markieren Helices. Der schwarze Pfeil markiert eine Helix mit wechselnder Händigkeit.

4.3.2.3 TEM

Für die TEM-Aufnahmen wurde die Negativkontrastierung eingesetzt. Dabei gilt generell, dass aus den Aufnahmen lediglich qualitative Aussagen gemacht werden können, da die Probe zum einen durch den Zusatz des Kontrastmittels (Phosphorwolframsäure) und zum anderen durch die anschließende Trocknung verändert wird. So haben zum Beispiel Kohler et al. für eine helicale Struktur eines bipolaren Lipids eine größere Flexibilität und kürzere Aggregate bei Negativkontrastierung im Vergleich zu cryomikroskopischen Aufnahmen beobachtet [121].

QA-Mizellen

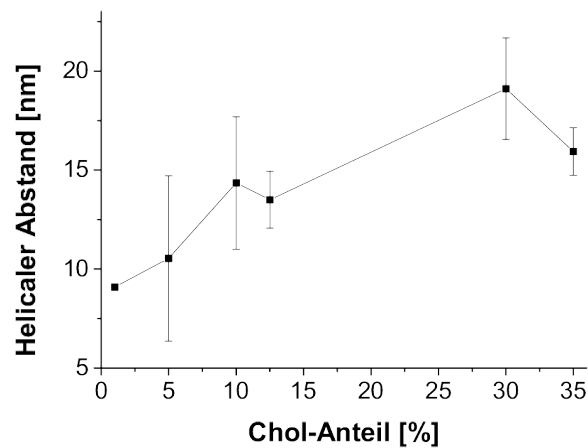
Abbildung 4.21 zeigt TEM-Aufnahmen der QA-Systeme mit unterschiedlichen Cholesterolanteilen. Eine Erhöhung des Cholesterolanteils verbessert den Kontrast der *wormlike micelles* wahrscheinlich aufgrund des höheren lipophilen Anteils im Kern. Cholesterolhaltige Assoziate können also im Gegensatz zu den Chol-freien Quil A-Mizellen sichtbar gemacht werden. Ab 1 % Chol können vereinzelt *wormlike micelles* detektiert werden; ab 5 % ist eine Detektion gut möglich. Insgesamt steigt der Anteil an nachweisbaren Mizellen mit der Konzentration an Cholesterol. Ob dies lediglich ein Effekt durch die Kontrastverbesserung oder durch ein Wachstum der Mizellen und damit eine verbesserte Nachweisbarkeit ist, kann nicht beurteilt werden.

Allen Proben ist gemeinsam, dass sie nicht als einfache *wormlike micelles* vorliegen, sondern eine helicale Überstruktur aufweisen. Diese wird von Demana et al. zwar nicht beschrieben, ist auf den TEM-Aufnahmen aber ebenfalls zu erkennen [18].

Die Durchmesser durch die Helix und durch den Zylinder ändern sich mit einer Änderung des Cholanteils nicht deutlich (Tab.: 4.8). Anders verhält es sich jedoch

Tab. 4.8: Parameter der QA-Helices aus den TEM-Aufnahmen [nm] ($1 \leq n \leq 11$).

Chol [%]	helicaler Abstand	Durchmesser der Helix	Durchmesser des Zylinders
1,0	9,1	10,4	3,0
5,0	10,5 \pm 4,2	10,2 \pm 1,0	3,6 \pm 0,4
10,0	14,4 \pm 3,4	8,1 \pm 1,9	3,5 \pm 0,2
12,5	13,5 \pm 1,4	11,8 \pm 3,9	3,2 \pm 0,4
30,0	19,1 \pm 2,6	10,5 \pm 1,5	3,6 \pm 0,5
35,0	15,9 \pm 1,2	12,6 \pm 2,7	3,6 \pm 0,2

**Abb. 4.22:** Helicaler Abstand \pm Standardabweichung der QA-Mizellen aus den TEM-Aufnahmen in Abhängigkeit vom Cholesterol-Anteil ($1 \leq n \leq 11$).

mit dem helicalen Abstand. Bei niedrigen Anteilen an Chol liegen bevorzugt kleine helicale Abstände vor, während der helicale Abstand mit steigendem Anteil größer wird. Dieser Effekt kann über die Messung der Parameter der Helix nachgewiesen werden¹ (Abb.: 4.22 und Tab.: 4.8) und entspricht Beobachtungen von Rades, der zwar einen großen Einfluss anderer Substanzen auf den helicalen Abstand, nicht jedoch auf den Durchmesser der Helix festgestellt hat [125].

Des Weiteren scheint es zwei unterschiedliche Kollektive an Helices zu geben, dies wird besonders deutlich bei der Probe mit 5 % Chol (Tab.: 4.9). Während das eine Kollektiv kleine helicale Abstände (7,9 nm) aufweist, besitzt das andere Kollektiv große Abstände (15,8 nm), wobei die beiden anderen Parameter davon unbeeinflusst

¹Es wurden alle auf den Aufnahmen zu findenden Helices vermessen, so dass die Anzahl der Helices für die Bestimmung eines Mittelwertes variiert. Bei 1 % Chol war lediglich eine Helix zu finden, so dass hier keine Standardabweichung angegeben werden kann.

Tab. 4.9: Parameter der unterschiedlichen Helixkollektive (5% Chol) aus den TEM-Aufnahmen [nm] (kleiner Abstand: $n=4$; großer Abstand: $n=2$).

Kollektiv	helicaler Abstand	Durchmesser der Helix	Durchmesser des Zylinders	Neigungswinkel [°]
kleiner Abstand	$7,9 \pm 1,3$	$10,5 \pm 0,9$	$3,5 \pm 0,4$	$13,7 \pm 3,0$
großer Abstand	$15,8 \pm 0,9$	$9,6 \pm 1,3$	$3,6 \pm 0,4$	$27,6 \pm 1,8$
alle	$10,5 \pm 4,2$	$10,2 \pm 1,0$	$3,6 \pm 0,4$	$18,3 \pm 7,6$

bleiben. Die Vergrößerung des gemittelten helicalen Abstandes scheint auf einer Veränderung des Verhältnisses von kleinen zu großen Abständen zu beruhen.

Die Vermutung, dass QA die einzelnen Segmente der Helix zusammenhält, liegt nahe. Dieser Zusammenhalt könnte durch hydrophile Wechselwirkungen der nach außen ragenden Zuckerreste realisiert werden. Nimmt die Konzentration der Zuckerreste durch eine Erhöhung der Konzentration an Chol in den Mizellen ab, werden die Segmente nicht mehr in gleichem Maße zusammengehalten und es bildet sich ein großer helicaler Abstand aus.

Bei der Selbstaggregation von Chol aus übersättigten Gallensalz-Systemen in Gegenwart von Phospholipiden entstehen als Zwischenstufe helicale Bänder. Auch hier werden zwei Kollektive mit jeweils unterschiedlichem Neigungswinkel beobachtet. Allerdings entsprechen die Winkel mit $54,1^\circ$ und $11,5^\circ$ nicht den hier vorliegenden Winkeln (s. Tab. 4.9). Im Fall der helicalen Bänder wird angenommen, dass es sich um spiralisierte, lamellare Cholesterol-Bänder handelt. Ihre Größe liegt im Mikrometerbereich [126, 127]. Die Unterschiede in Größe und Neigungswinkel sind aufgrund der in den Selbstaggregaten vorliegenden flüssigkristallinen oder kristallinen Struktur nicht verwunderlich. Die Bildung der helicalen Bänder zeigt jedoch die Fähigkeit von Sterolgerüsten, helicale Strukturen auszubilden. Die Autoren erklären das Vorliegen der zwei Kollektive über einen unterschiedlichen molekularen Einbau des Cholesterols.

Für die Entstehung einer helicalen Struktur ist eine Verkipfung der Moleküle zueinander erforderlich. Für die Entstehung der Verkipfung gibt es zwei Möglichkeiten:

- Ausgehend von der Leitsubstanz QS-21 könnten die unterschiedlich großen Zuckerreste sterisch eine Verkipfung der Ringgerüste erzwingen.
- Die Ergebnisse des Molecular Modelling zeigen, dass die Ringsysteme von Chol und QS-21 nicht parallel zueinander zu liegen kommen, sondern aufgrund ihrer Methylreste leicht verkippt aufeinander liegen.

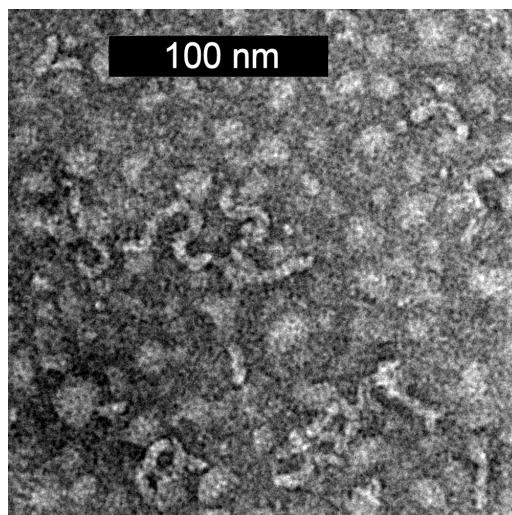


Abb. 4.23: TEM-Aufnahme von XQA-Mizellen mit 35 % Chol nach Negativkontrastierung

In den TEM-Aufnahmen scheinen sowohl rechts- als auch linkshändige Helices vorzuliegen, wobei die rechtshändigen Helices leicht dominieren (zu beachten ist dabei jedoch, dass eine Beurteilung des Drehsinns mittels Negativkontrastierung durchaus problematisch ist [128]). Dies ist überraschend, da für die Bildung eines Drehsinns meistens Chiralität eine Voraussetzung ist. Liegt ein Enantiomer einer Substanz vor, kann nur die zugehörige links- oder rechtshändige Struktur aufgebaut werden. Ein solches Verhalten wurde auch vielfach beobachtet [129, 128]. Einige Systeme hingegen – darunter die weiter oben beschriebenen helicalen Cholesterolselbstaggregate – können in Systemen mit gereinigten Enantiomeren sowohl rechts- als auch linkshändige Helices ausbilden. Aus diesem Grund wird angenommen, dass die Chiralität einer Substanz nicht allein für die Bildung helicaler Strukturen verantwortlich ist. Abschließende Erklärungen für das Phänomen gibt es jedoch noch nicht [127, 128].

Hohe Konzentrationen an Chol bewirken eine verstärkte Flexibilität der *wormlike micelles*. Zusätzlich ist zu beobachten, dass bei 30 und 35% Chol-Anteil oft der Drehsinn der Helices innerhalb einer Helix von links- nach rechtshändig wechselt (s. Abb. 4.21 C, weißer Pfeil). Setzt man als Grund für die Helixbildung unterschiedlich große Zuckerreste voraus, ist eine mögliche Ursache, dass Chol als Abstandhalter zwischen den voluminösen Resten fungiert. In diesem Fall ist nach dem Einbau einiger Chol-Moleküle hintereinander der Einbau von Quil A um 180° gedreht sterisch nicht mehr behindert, die Händigkeit der Helix kann wechseln.

Tab. 4.10: Parameter der XQA und QA Helices mit 35 % Chol aus den TEM-Aufnahmen [nm] (QA: $n=5$; XQA $n=5$)

Quil A	helicaler Abstand	Durchmesser der Helix	Durchmesser des Zylinders
QA	$15,9 \pm 1,2$	$12,6 \pm 2,7$	$3,6 \pm 0,2$
XQA	$17,9 \pm 4,6$	$10,1 \pm 1,9$	$5,0 \pm 0,4$

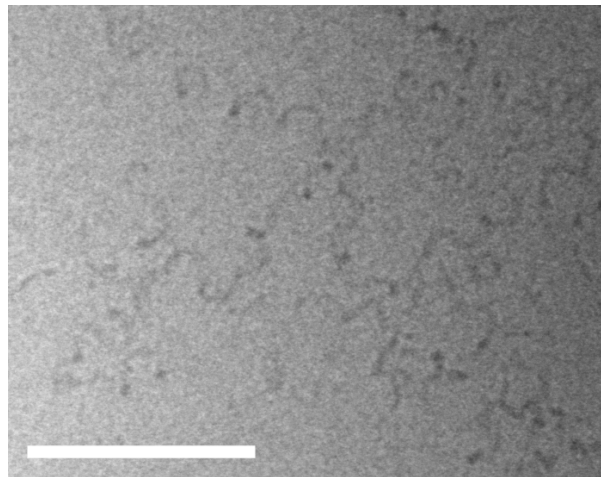


Abb. 4.24: Cryo-TEM Aufnahme von QA-Mizellen mit 12,5 % Chol (Balken: 100 nm).

XQA-Mizellen

Abbildung 4.23 zeigt eine TEM-Aufnahme der XQA-Mizellen mit 35 % Chol. Auch hier ist eine helicale Überstruktur zu erkennen, wenn auch nicht so deutlich wie bei den QA-Mizellen. In Tabelle 4.10 sind die aus den Aufnahmen ausgemessenen Parameter der Helices angegeben. Während kein deutlicher Unterschied in Bezug auf den helicalen Abstand und den Durchmesser der Helix zu erkennen ist, ist der Durchmesser des Zylinders im Fall der XQA-Mizellen wesentlich dicker.

Ohne Chol ist auch hier der Kontrast nicht ausreichend, um die Assoziate darstellen zu können.

4.3.2.4 Cryo-TEM

Um auszuschließen, dass es sich bei den beobachteten Helices um Artefakte aus der Negativkontrastierung handelt, wurden zusätzlich Cryo-TEM Untersuchungen von QA-Mizellen durchgeführt. Hier kann die Probe ohne vorherige Behandlung direkt im Lösungsmittel dargestellt werden. Die hier eingesetzte Charge ist, im Gegensatz

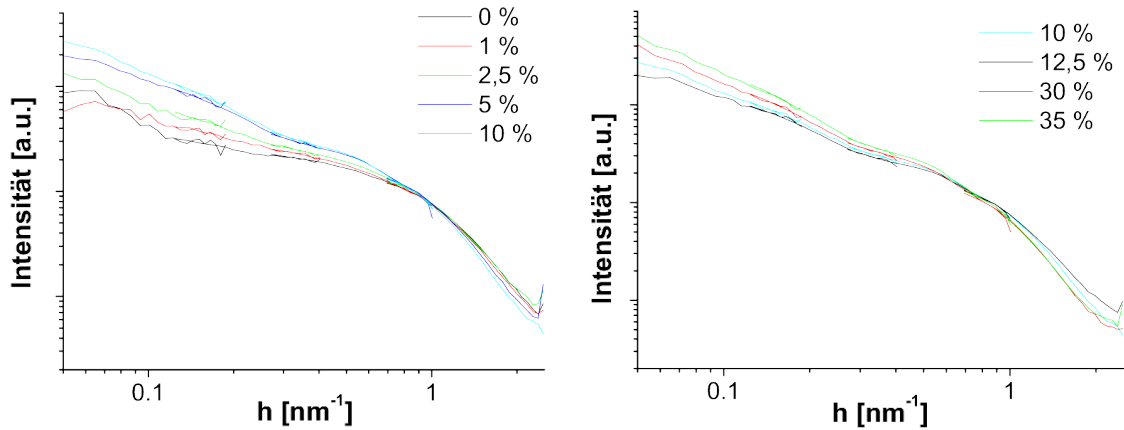


Abb. 4.25: SANS-Streukurven der QA-Mizellen mit unterschiedlichem Anteil an Chol.

zu den sonstigen in diesem Abschnitt beschriebenen Ergebnissen, Charge A. Auf die Unterschiede in den Chargen wird in Abschnitt 4.3.2.7 eingegangen.

Abbildung 4.24 zeigt deutlich eine Spiralisierung der *wormlike micelles*. Die mittels Negativkontrastierung im TEM beobachteten Strukturen sind also keine Artefakte.

Die in Abschnitt 4.3.2.7 angegebenen und diskutierten helicalen Parameter befinden sich in einem ähnlichen Größenbereich wie mittels TEM bestimmt.

4.3.2.5 SANS

Abbildung 4.25 zeigt die Ergebnisse der SANS-Untersuchungen von QA-Systemen in Abhängigkeit vom Chol-Anteil. Bereits ein Anteil von 1 % Chol bewirkt eine Erhöhung der Streuintensität bei mittleren Winkeln ($0,1 - 0,3 \text{ nm}^{-1}$). Wird der Anteil an Chol weiter erhöht, setzt sich dieser Trend deutlich fort. Zusätzlich ist zu erkennen, dass eine verstärkte Streuintensität bei kleinen Winkeln auftritt. Bei keiner der cholesterolphaltigen Formulierungen ist ein Guinierverhalten zu erkennen. Wie bereits im Abschnitt 4.3.1.3 beschrieben, ist der erneute Anstieg der Kurve ohne Chol-Zusatz im Bereich kleiner Winkel wahrscheinlich auf ungelöste Verunreinigungen zurückzuführen, so dass der flache Bereich der Kurve im mittleren Winkelbereich durch die Größe der eigentlichen Mizellen hervorgerufen wird. Ab 2,5 % Chol ist kein derartiges Guinierverhalten mehr zu beobachten. Die Aggregate sind also zu groß, um als Ganzes nachgewiesen werden zu können.

Bereits ab einem Anteil von 1 % Chol ist ein lineares Verhalten der Kurven im Power-Plot zu beobachten. Abbildung 4.26 zeigt die Steigung der Kurven in Abhängigkeit vom Chol-Anteil. Die Steigung entspricht der Proportionalität der Streuintensität zum Streuvektor, die für steife Zylinder h^{-1} und für flexible $h^{-1,67}$ beträgt. Die

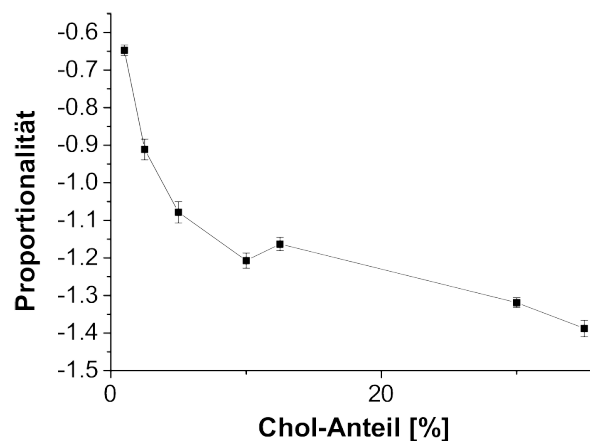


Abb. 4.26: Proportionalität der Streuintensität zum Streuvektor bei kleinen Winkeln in Abhängigkeit vom Chol-Anteil (Fehlerbalken: Fehler des Fits).

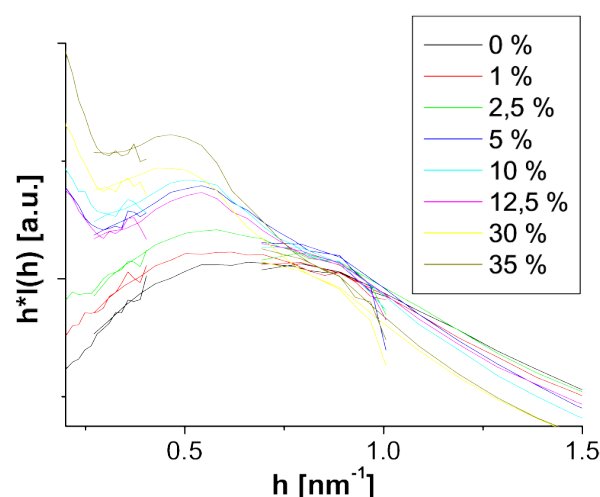


Abb. 4.27: Holtzer-Plot der QA-Mizellen mit unterschiedlichem Anteil an Chol

Zugabe des Chol bewirkt also ein eindimensionales Wachstum und damit die Bildung von *wormlike micelles*.

Die Steigung wird mit größer werdendem Chol-Anteil immer steiler, was für einen größeren Anteil flexibler Mizellen spricht. Dies ist im Einklang mit den TEM-Aufnahmen, die den Schluss nahelegen, dass Chol die Flexibilität sowohl der *wormlike micelles* als auch der helicalen Überstruktur erhöht (s. 4.3.2.3).

Auf das Vorliegen einer helicalen Überstruktur, wie sie in den TEM-Aufnahmen beobachtet werden, deutet der Reflex bei mittleren Winkeln ($0,3 - 0,7 \text{ nm}^{-1}$) hin². Deutlicher ist der Reflex im Holtzer-Plot zu erkennen (Abb.: 4.27). Das Maximum ist ab einem Chol-Anteil von 5 % nachweisbar und nimmt mit steigendem Chol-Anteil

²Die Entstehung eines solchen Reflexes ist ausführlich in Abschnitt 4.3.1.3 für reine XQA-Mizellen diskutiert.

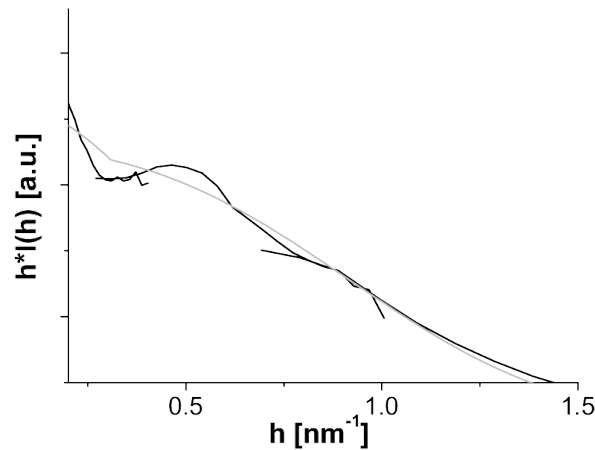


Abb. 4.28: SANS-Streukurve der QA-Mizellen mit 35 % Chol (schwarz) mit zugehörigem helicalen Fit (grau) im Holtzer-Plot.

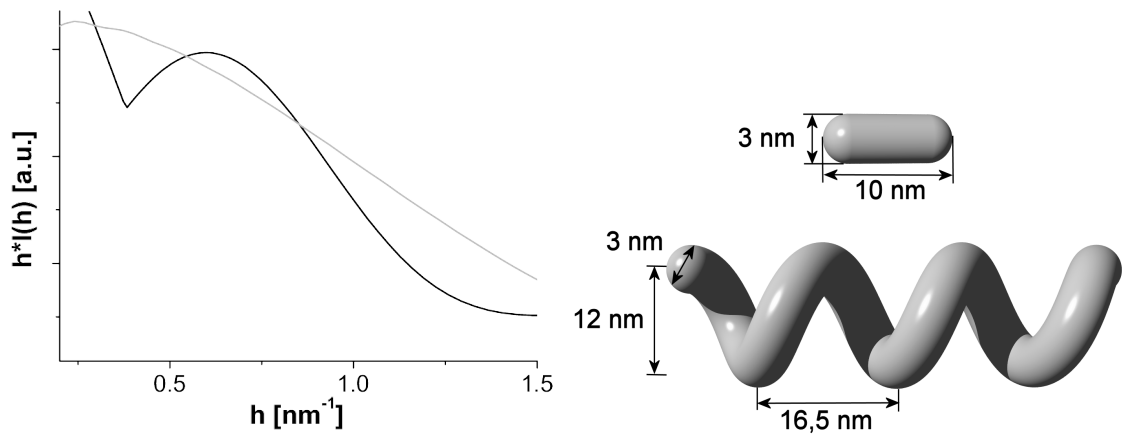


Abb. 4.29: Simulation der Streukurve einer unendlich langen Helix (schwarz) verglichen mit der eines Zylinders (grau). Parameter: s. Modelle rechts.

an Intensität zu. Dies spricht dafür, dass das zuvor beschriebene eindimensionale Wachstum mit der gleichzeitigen Ausbildung einer helicalen Überstruktur erfolgt. Die Intensität des Maximums steigt dabei automatisch mit der Länge der Mizellen an.

Um die Parameter der Helix zu bestimmen, wurden Fits mittels eines analytischen helicalen Modells durchgeführt [122]. Abbildung 4.28 zeigt beispielhaft das Ergebnis eines Fits. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Ergebnis unzureichend ist. Insbesondere das Maximum des Fits ist nur sehr schwach ausgeprägt. Des Weiteren ergibt ein Vergleich der bestimmten Parameter mit denen der TEM-Aufnahmen eine große Diskrepanz, wobei eine mögliche Erklärung dafür in der Negativkontrastierung liegen kann.

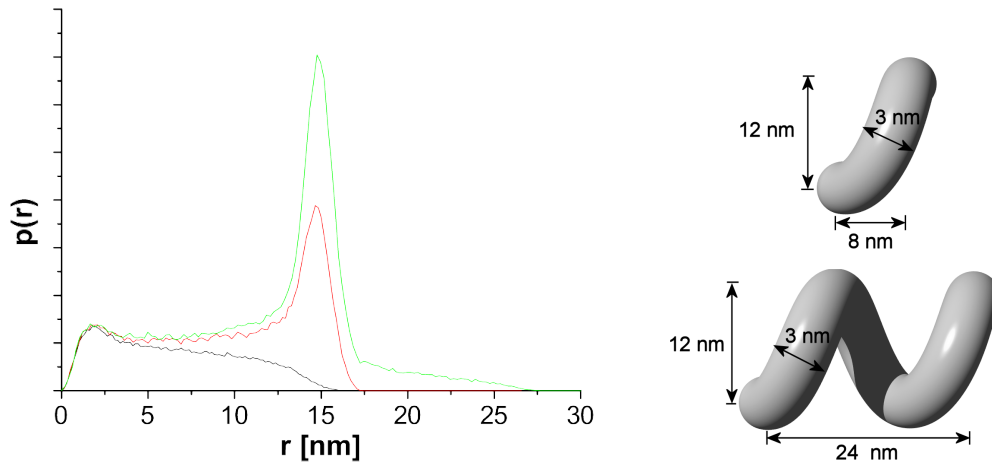


Abb. 4.30: Links: Simulationen der PDDFs von Helices unterschiedlicher Länge: 8 nm (schwarz) 16 nm (rot) 24 nm (grün) Rechts: zugehörige Modelle Länge 8 nm (oben) und 24 nm (unten)

Ein anderer Grund für die Diskrepanzen ergibt sich aus der Polydispersität des Systems. Unterschiede im helicalen Abstand und dem Durchmesser der Helix resultieren im Wesentlichen in einer Verbreiterung des Reflexes, da durch sie seine Position und Intensität beeinflusst werden. Anders verhält es sich mit der Länge der Helix. Der Einfluss der Länge auf die Streukurve wird in Abbildung 4.29 dargestellt. Hier wird die Streukurve eines kurzen Zylinders mit der einer unendlich langen Helix verglichen. Für kurze Helices wurde die Streukurve eines Zylinders gewählt, da Stücke, die kürzer als der helicale Abstand sind, annähernd die Streukurve eines Zylinders aufweisen (s. Abb. 4.30, oberes Modell). Für die Simulation wurde der Zylinder vereinfacht als starr angesehen, da für den entsprechenden flexiblen Zylinder kein Modell vorlag. Diese Vereinfachung ist jedoch legitim, da sich die Flexibilität bei einem entsprechend kurzen Stück noch nicht stark auf die Streukurve auswirkt. Obwohl der Querschnitt des Zylinders für beide Simulationen der gleiche ist, ergeben sich in der Streukurve deutliche Unterschiede (Abb. 4.29). Bei großen Winkeln verläuft die Kurve der Helix wesentlich steiler als die des Zylinders. Der Grund erklärt sich aus der PDDF einer Helix. Abbildung 4.30 zeigt Simulationen der PDDFs von Helices mit unterschiedlicher Länge. Die Information über den Zylinderquerschnitt nimmt mit abnehmender Länge der Helices im Verhältnis zum Rest der Kurve zu. Dieser Effekt ist besonders ausgeprägt, wenn die Länge der Helix kürzer als der helicale Abstand ist.

Liegen also kurze Zylinder neben Helices vor, tragen beide Kollektive zur Streuung bei. Die Zylinder erhöhen die Streuung bei großen Winkeln, während Helices eine vergleichsweise kleine Intensität bei großen Winkeln aufweisen. Gleichzeitig enthält der Bereich großer Winkel sehr viele Datenpunkte, so dass er durch das Fit-Programm

Tab. 4.11: Ergebnisse der Zylinder Fits \pm Fehler des Fits in Abhängigkeit vom Chol-Anteil [nm]

Parameter	0 % Chol	1 % Chol
Durchmesser des Zylinders	$2,76 \pm 0,07$	$2,80 \pm 0,02$
Länge	$6,3 \pm 0,3$	$8,6 \pm 0,05$

stark gewichtet wird, es erfolgt also ein Fit für diesen Bereich, mit der Folge, dass das Maximum der Streukurve nicht ausreichend angepasst wird (Abb. 4.28).

Mit den vorliegenden Informationen kann eine weitere Veränderung der Streukurven beurteilt werden: Mit zunehmendem Anteil an Chol wird die Kurve bei großen Winkeln steiler. Geht man von einem eindimensionalen Wachstum durch den Chol-Zusatz aus, verringert sich der Anteil kurzer Zylinder zugunsten langer Helices. Daraus resultierend wird die Steigung in diesem Bereich vergrößert.

Um Aussagen über die Länge von Helices zu bekommen, können Fits mit dem Programm LORES für Helices durchgeführt werden [130]. Mit diesem Programm kann auch die Länge der Helix angepasst werden. LORES geht für den Fit allerdings von steifen Helices aus. TEM zeigt jedoch, dass die realen Helices ebenfalls flexibel sind (s. 4.3.2.3). Dies führt zu einer größeren Steigung der gemessenen Streukurven bei kleinen Winkeln im Vergleich zu starren Helices. Damit ist ein Fit unter Verwendung der kleinen Winkel nicht möglich. Ignoriert man kleine Winkel, ist ein Fit möglich, aber die Information über die Länge geht verloren. Somit ermittelt man lediglich mögliche Kombinationen aus der Länge, dem helicalen Abstand und dem Durchmesser der Helix, die in dem entsprechenden Maximum resultieren. Die durchgeführten Fits lassen daher keine definitiven Aussagen über die realen Helices zu.

Bei einem Anteil von 1 % Chol ist der helicale Anteil noch so gering, dass ein Fit für homogene Zylinder möglich ist (Tab. 4.11) Durch den Chol-Zusatz sind die Mizellen von 6,3 nm auf 8,6 nm angewachsen, wobei der Durchmesser des Zylinders unverändert bleibt.

Bereits bei 2,5% Chol weicht die Streukurve so stark von der eines Zylinders ab, dass ein Fit nicht mehr möglich ist.

Im Holtzer-Plot (Abb.: 4.27) ist weiterhin zu sehen, dass die Position des Maximums der Streukurve mit zunehmendem Gehalt an Chol zu kleineren Winkeln verschoben wird. Dies entspricht den Beobachtungen der TEM-Aufnahmen, die mit zunehmendem Anteil an Chol eine Vergrößerung des helicalen Abstands zeigen. Aufgrund der fehlenden Möglichkeit eines Fits lässt sich dies jedoch nicht in Zahlen ausdrücken.

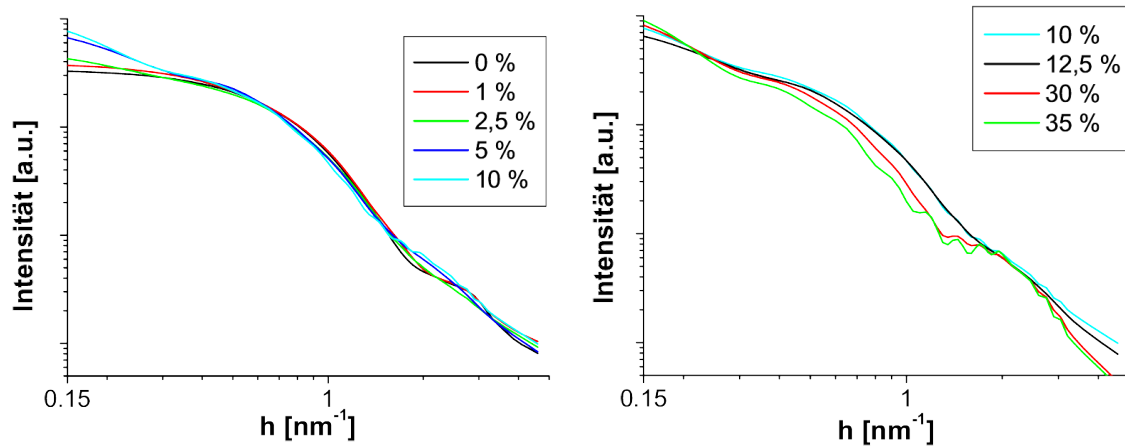


Abb. 4.31: entschmierte SAXS-Streukurven der QA-Mizellen mit unterschiedlichem Anteil an solubilisiertem Chol

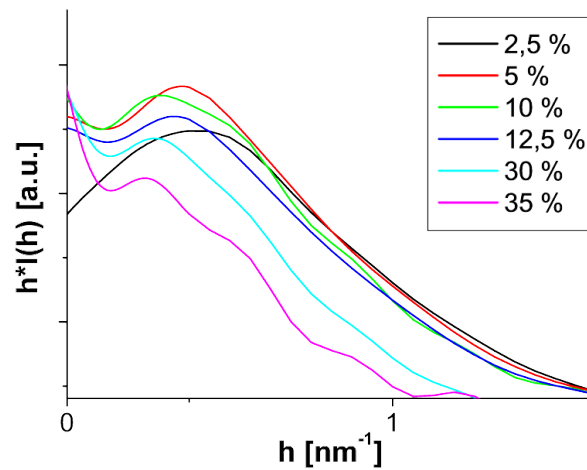


Abb. 4.32: Holtzer-Plot der SAXS-Streukurven mit unterschiedlichen Chol-Anteil

4.3.2.6 SAXS

Abbildung 4.31 zeigt die SAXS-Streukurven der oben beschriebenen Systeme. Auch hier ist eine Zunahme der Intensität bei kleinen Winkeln durch eine Chol-Zugabe zu erkennen. Daraus kann auf eine Vergrößerung der Mizellen durch die Solubilisation von Chol geschlossen werden. Da kein Guinierverhalten zu erkennen ist, sind die Assoziate zu groß, um als Ganzes vermessen werden zu können. Die Steigung der Kurve im Power-Plot und damit die Proportionalität bei kleinen Winkeln verhält sich analog den SANS-Messungen (Abschnitt 4.3.2.5). Es kann also auch hier von einem eindimensionalen Wachstum flexibler Mizellen ausgegangen werden. Zu beachten ist jedoch, dass insbesondere der Bereich sehr kleiner Winkel stark von der Abbruchbedingung der ITP beeinflusst wird.

Tab. 4.12: Ergebnisse des Fits der QA-Mizellen an einen inhomogenen Zylinder bei unterschiedlichem Chol-Anteil [nm]

Parameter	0 % Chol	1 % Chol
Durchmesser des Zylinders	3,7	3,7
Durchmesser des lipophilen Kerns	3,0	3,0
Länge	8,2	10,7

Ab einem Gehalt von 5 % ist deutlich die Ausprägung eines Maximums zu erkennen. Dieses Maximum entsteht wahrscheinlich – wie bereits diskutiert – durch die Bildung einer helicalen Überstruktur. Betrachtet man die Kurven im Holtzer-Plot (Abb. 4.32), kann – analog den SANS-Messungen – tendenziell eine Verschiebung des Maximums zu kleineren Winkeln beobachtet werden.

Analog zu den Chol freien QA-Mizellen ist bei großen Winkeln die Ausbildung einer Oszillation zu erkennen (Abb.: 4.31). Diese Oszillation ist auf den inhomogenen Aufbau des Zylinderquerschnitts zurückzuführen. Aus diesem Grund kann auch kein Fit erfolgen, da kein analytisches Modell für eine inhomogene Helix vorliegt. Ein Fit an die zylinderförmigen, kurzen Assoziate bei niedrigem Chol-Anteil ist jedoch möglich. Die resultierenden Ergebnisse sind in Tabelle 4.12 dargestellt. Das Anwachsen der Zylinder durch den Zusatz von 1 % Chol um 2,5 nm ist deutlich zu erkennen. Des weiteren ist die ermittelte Länge der Zylinder mit 10,7 nm um etwa 2 nm größer als mittels SANS bestimmt, was über den unterschiedlichen Kontrast begründet werden kann (s. 4.3.1.4).

4.3.2.7 Chargenkonformität von QA

Quil A ist ein aufgereinigtes Naturprodukt, das dementsprechend natürlichen Schwankungen in der Zusammensetzung unterliegt. Um diesen Einfluss zu untersuchen, wurde ein Teil der oben beschriebenen Untersuchungen der Charge B an einer weiteren Charge A durchgeführt. Die vom Hersteller mitgelieferten Chromatogramme zeigen deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung der beiden Chargen. Diese können jedoch nicht weiter interpretiert werden, da die zugrundeliegenden Untersuchungsmethoden nicht bekannt sind. Eine Analyse der genauen Zusammensetzung könnte weitere Aufschlüsse geben, ist jedoch im Rahmen dieser Arbeit – aufgrund der Komplexität des Gemisches – nicht erfolgt. Erschwerend kommt hinzu, dass nach wie vor nicht alle Bestandteile von Quil A bekannt sind.

Tab. 4.13: Helicale Parameter der beiden Chargen bei unterschiedlichem Chol-Gehalt [nm] ($4 \leq n \leq 11$).

Chol [%]	Charge	helicaler Abstand	Durchmesser der Helix	Durchmesser des Zylinders
12,5	A	$13,6 \pm 1,9$	$7,8 \pm 1,5$	$3,2 \pm 0,5$
12,5	B	$13,5 \pm 1,4$	$11,8 \pm 3,9$	$3,2 \pm 0,4$
35,0	A	$16,5 \pm 1,7$	$9,5 \pm 1,2$	$3,5 \pm 0,5$
35,0	B	$15,9 \pm 1,2$	$12,6 \pm 2,7$	$3,6 \pm 0,2$

Tab. 4.14: Helicale Parameter nach Bestimmung mittels TEM und Cryo-TEM (12,5 % Chol) [nm] ($8 \leq n \leq 11$).

Methode	Charge	helicaler Abstand	Durchmesser der Helix	Durchmesser des Zylinders
Cryo-TEM	A	$17,7 \pm 2,1$	$8,6 \pm 1,8$	$3,0 \pm 0,4$
TEM	A	$13,6 \pm 1,9$	$7,8 \pm 1,5$	$3,2 \pm 0,5$
TEM	B	$13,5 \pm 1,4$	$11,8 \pm 3,9$	$3,2 \pm 0,4$

TEM

Die Ergebnisse der TEM Untersuchungen an Charge A entsprechen denen der Charge B. Erst der Zusatz von Chol macht eine Darstellung der *wormlike micelles* möglich, die eine entsprechende helicale Überstruktur aufweisen.

Vermisst man die Helices, ergibt sich das in Tabelle 4.13 dargestellte Bild. Charge A zeigt analog Charge B die Tendenz, dass mit zunehmendem Gehalt an Chol der helicale Abstand steigt, während der Durchmesser der Helix und des Zylinders davon unbeeinflusst bleiben. Während beide Chargen einen identischen helicalen Abstand und Durchmesser durch den Zylinder aufweisen, ergibt sich ein Unterschied im Durchmesser der Helix, der bei Charge A tendenziell kleiner ist. Da bei Charge B der Durchmesser der Helix einer vom Cholesterolanteil unabhängigen großen Schwankung unterliegt (Tab. 4.8: 8,1 - 12,6 nm), kann es sich hier jedoch auch um einen statistischen Effekt handeln.

Cryo-TEM

Tabelle 4.14 zeigt die helicalen Parameter in Abhängigkeit von Charge und Messmethode. Es fällt auf, dass der helicale Abstand bei den Cryo-TEM Messungen größer ist als in den TEM-Aufnahmen beider Chargen. Dies spricht dafür, dass der helicale

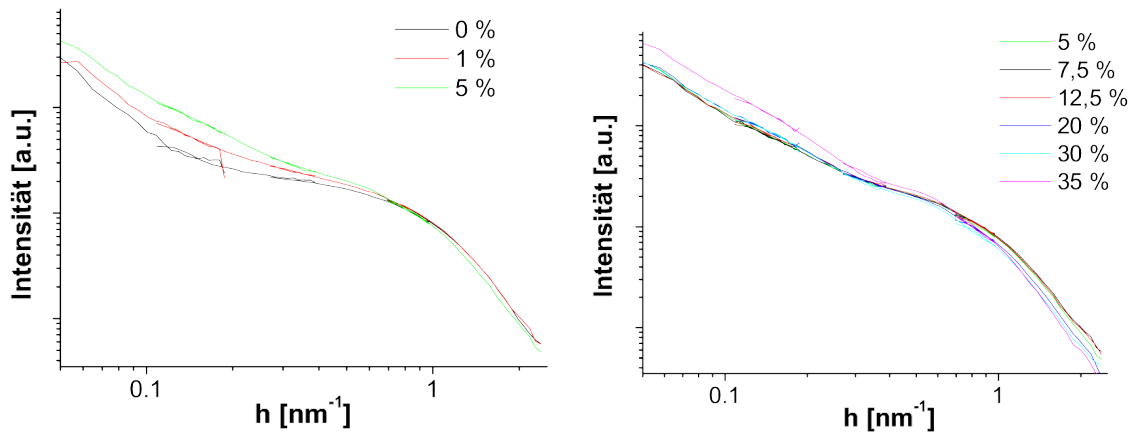


Abb. 4.33: SANS Streukurven der Charge A mit unterschiedlichem Anteil an Chol.

Abstand der empfindlichste Parameter gegenüber Änderungen der Präparation und des Cholesterolanteils ist. Dies entspricht der Beobachtung von Rades, der festgestellt hat, dass durch äußere Einflüsse zwar oft der helicale Abstand, selten jedoch der Durchmesser der Helix variiert [125]. Die weiteren ausgemessenen Parameter stimmen mit denen der Negativkontrastierung überein. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse der Negativkontrastierung zumindest tendenziell ausgewertet werden können.

Kleinwinkelstreuung

Betrachtet man die SANS und SAXS Streukurven von Charge B, kann man eine Gruppierung der Streukurven in Abhängigkeit vom Chol-Anteil vornehmen (Abb.: 4.25 und 4.31). So ist eine sehr schnelle Änderung der Steigung bei Winkeln von etwa $0,2 - 1 \text{ nm}^{-1}$ bis zu einem Anteil von 5% Chol zu erkennen. Wird der Anteil weiter erhöht, ändert sich die Streukurve bis 12,5% Chol nur geringfügig. Bei 30 und 35 % hingegen ist eine wesentlich größere Steigung der Kurven – und damit eine erhöhte Flexibilität der Mizellen – zu beobachten.

Eine derartige Gruppierung kann auch für die Kurven von Charge A festgestellt werden. Allerdings sind hier andere Konzentrationen zu benennen (Abb.: 4.33). Die Steigung bei kleinen Winkeln ändert sich nur leicht zwischen 5 und 30 % Chol und steigt erst bei 35 % sprunghaft an. Die gleiche Beobachtung kann mittels SAXS an Charge A gemacht werden (Daten nicht dargestellt).

Ein weiterer Unterschied wird deutlich, wenn man die SANS-Kurven der Charge A mit niedrigen Chol-Anteilen betrachtet. Die Streuung bei kleinen Winkeln – die im Vorfeld ungelösten Verunreinigungen zugeordnet wurde (s. Abschnitt 4.3.1.3) – ist

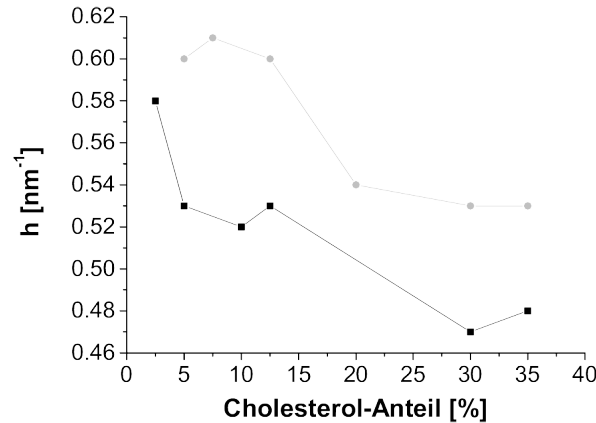


Abb. 4.34: Position des Reflexes bei den SANS-Messungen der beiden QA-Chargen in Abhängigkeit vom Chol-Anteil (Charge A: grau; Charge B: schwarz).

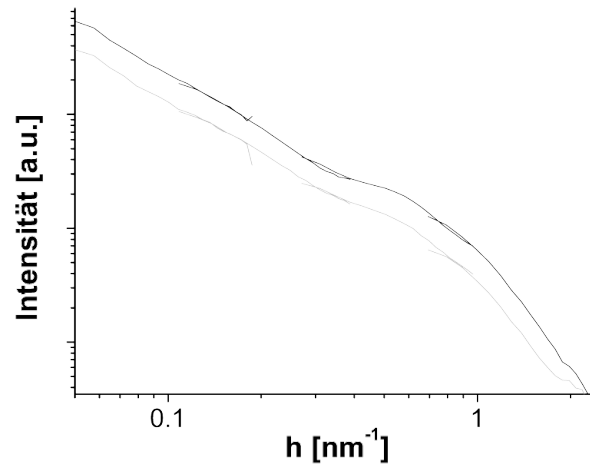


Abb. 4.35: SANS Streukurven für hohe Chol-Anteile: 35 % (schwarz) und 65 % (grau).

hier wesentlich stärker ausgeprägt als bei Charge B und selbst bei einem Anteil von 1 % Chol noch nachweisbar.

Sämtlichen Streukurven der Charge A und B ist gemein, dass sie ein Maximum aufweisen, das einer helicalen Überstruktur zugeordnet werden kann. Die Position des Maximums von Charge A weicht jedoch leicht von dem der Charge B ab. Erhalten bleibt jedoch die Tendenz, dass mit zunehmendem Chol-Anteil das Maximum zu kleineren Winkeln, also größeren Abständen, verschoben wird (Abb.: 4.34). Die TEM-Untersuchungen zeigten tendenziell einen etwas kleineren Durchmesser der Helix für Charge A im Vergleich zu Charge B, was die Verschiebung des Maximums zu größeren Winkeln bei Charge A erklären könnte.

Zusätzlich wurde bei diesen Messungen ein größerer Anteil als 35 % Chol untersucht (Abb.: 4.35). Die Folge – für SANS und SAXS – ist eine Parallelverschiebung der Streukurve im Power-Plot zu niedrigeren Streuintensitäten bei Chol-Anteilen über

35 %. Dies kann auf das Überschreiten einer maximal solubilisierbaren Menge an Chol zurückzuführen sein. Übersteigt der Chol-Anteil diesen Wert, fällt überschüssiges Chol aus und wird im Zuge der Probenaufbereitung abfiltriert. Das Konzentrationsverhältnis innerhalb der Mizellen und damit auch ihre Form bleibt unverändert.

Eine Herstellung von *wormlike micelles* scheint demnach chargenunabhängig möglich zu sein. Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung ergeben sich jedoch geringfügige Unterschiede zwischen den einzelnen Chargen. In wieweit sich dies auf die Herstellung von z.B. ISCOMs auswirkt, lässt sich daraus jedoch nicht ableiten.

4.3.2.8 Lagerung des QA

Quil A unterliegt bei Lagerung Instabilitäten. Im wässrigen Milieu sind dies insbesondere Hydrolyse der Zuckerreste und eine Isomerisierung [101]. Im gefriergetrockneten Zustand schreibt der Hersteller eine Lagertemperatur von $-25 - 25^{\circ}\text{C}$ vor und gibt ein Mindesthaltbarkeitsdatum (MHD) 5 Jahre nach Herstellung an. Ob Instabilitäten in Abwesenheit von Wasser existieren, ist in der Literatur nicht beschrieben.

In diesem Abschnitt wird der Einfluss der Lagerung – noch vor Ablauf des MHD – auf die Solubilisierung von Chol beschrieben. Das QA wurde über den gesamten Zeitraum im Gefrierschrank bei -20°C gelagert. Die Untersuchungen wurden mit QA der Charge A und B durchgeführt (s. 4.2.1). Die Herstellungen der Systeme mit dem „gelagerten“ QA fanden nach folgenden Zeiträumen nach der Herstellung des Quil A statt: 25 Monate (Charge A) bzw. 27 Monate (Charge B). Die Formulierungen mit „frischem“ QA wurden 17 Monate (Charge A) bzw. 8 Monate (Charge B) nach der Quil A Herstellung hergestellt.

TEM

Wie in Abschnitt 4.3.2.7 dargestellt, erfolgte durch die Solubilisierung von Cholesterol in den QA-Mizellen der „frischen“ Chargen ein Auswachsen der Mizellen zu *wormlike micelles*. Erfolgte die Herstellung mit „gelagertem“ QA, konnten mittels TEM keine Assoziate nachgewiesen werden.

PCS

Abbildung 4.36 stellt die gemessenen Größen der QA-Assoziate der „frischen“ QA-Charge B im Vergleich zur „gelagerten“ dar. Mit „gelagertem“ QA ist eine Repro-

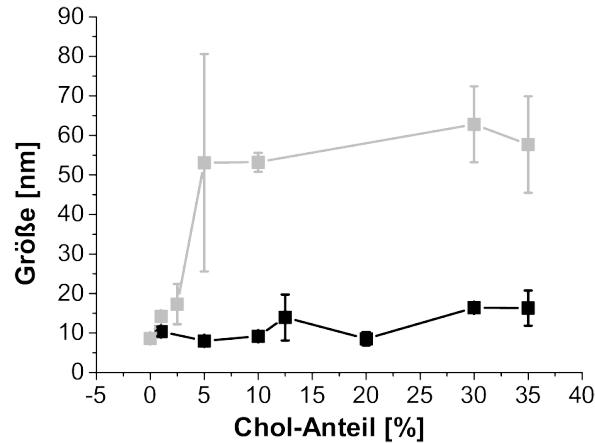


Abb. 4.36: GröÙen der *wormlike micelles* hergestellt mit „gelagertem“ (schwarz) und „frischem“ QA (grau) der Charge B (n=3).

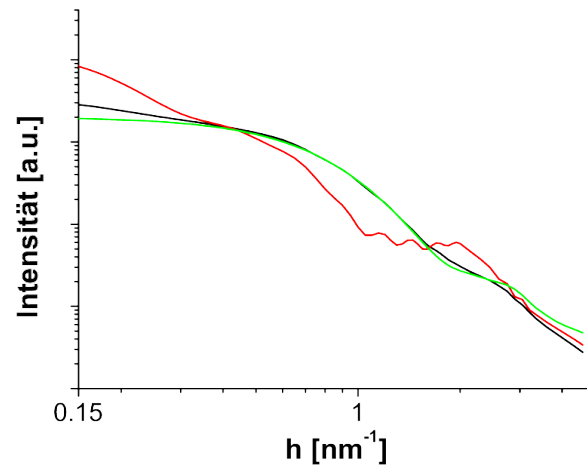


Abb. 4.37: SAXS-Streukurven der QA-Aggregate 35 % Chol in „gelagertem“ (schwarz) bzw. „frischem“ QA (rot) und 0 % Chol in „frischem“ QA (grün) der Charge B.

duktion der PCS-Daten nicht möglich, da die hier erhaltenen GröÙen wesentlich kleiner sind. Dieser Effekt wird zusammen mit den SAXS-Ergebnissen im nächsten Abschnitt ausführlicher diskutiert.

SAXS

Vergleicht man die Streukurven in Abbildung 4.37, ist eindeutig zu erkennen, dass ein ausgeprägtes Wachstum der Mizellen – bei der Herstellung mit „gelagertem“ QA – durch die Solubilisation von Chol ausbleibt. Diese Beobachtung trifft prinzipiell auf beide Chargen zu. Während die „gelagerte“ Charge A gar kein Wachstum bei einer Erhöhung des Chol-Anteils zeigt, ist bei der „gelagerten“ Charge B nach wie vor ein schwach ausgeprägtes Anwachsen der Mizellen zu erkennen (Abb: 4.37).

Das Ausbleiben der Bildung großer Assoziate bestätigt die oben dargestellten Ergebnisse der PCS-Untersuchungen.

Das Phänomen trat bei Charge A sehr plötzlich auf (zwischen dem 23. und 25. Monat nach der Herstellung des QA), so dass zunächst nach möglichen Fehlerursachen in der Herstellung gesucht wurde. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde lediglich der pH des Puffers mittels pH-Meter eingestellt, so dass theoretisch die Ionenstärke zwischen den Versuchsreihen variieren konnte. Um dies als Fehlerquelle auszuschließen, wurden Formulierungen mit 35 % Chol in Puffern unterschiedlicher Ionenstärke (135 mM; 140 mM; 145 mM) hergestellt. Es ergaben sich keine Unterschiede in den Streukurven. In allen Fällen blieb ein Wachstum der Mizellen aus. Dies ist im Einklang mit der Literatur. Demana et al. zeigten, dass das eingesetzte Lösungsmittel (Wasser oder Tris-Puffer) einen Einfluss auf die pseudoternären Systeme hat, wobei sie jedoch elektronenmikroskopisch keinen Einfluss auf das pseudobinäre System Quil A/Cholesterol beobachteten [18]. Auch Mitra und Dungan, die den Einfluss von Salzkonzentration und pH auf reine Quil A-Mizellen untersuchten, konnten zwar eine Beeinflussung der CMC, nicht aber der Größe der Mizellen nachweisen [13].

Auch ein Ersatz des Cholesterols durch eine andere Chol-Charge konnte keine Ausbildung von *wormlike micelles* bewirken.

Da an der Herstellung nichts geändert wurde, ist eine weitere mögliche Ursache ein im Verlauf der Lagerung verändertes QA. Um dies zu überprüfen, wurde Charge B als Ersatz für Charge A beschafft. Eine Reproduktion der Daten ist damit, wie in Abschnitt 4.3.2.7 gezeigt, in Grenzen möglich.

Auch mit „frisch“ geliefertem, beim Hersteller gelagertem Quil A der Charge B ließ sich nur ein schwach ausgeprägtes Auswachsen der Assoziate beobachten. Das oben beschriebene Phänomen ist also unabhängig von der Lagerung am Institut bzw. beim Hersteller.

Zieht man die Aussage von Hu et al. mit in Betracht, dass bereits vermeintlich geringfügige Änderungen an Saponinen eine große Affinitätsänderung zu Lipidmembranen bewirken [87], so ist eine wahrscheinliche Ursache eine chemische Veränderung des QAs während der Lagerung. Die Art sowie der Grund der Veränderung sind nicht bekannt. Derartige Probleme durch die Lagerung des QA wurden bisher nicht beschrieben, wobei die meisten Studien über QA sich mit pseudoternären Mischungen beschäftigen. Zumindest ISCOMs können auch mit „gelagertem“ QA der gleichen Charge unverändert hergestellt werden [131]. Es ist also anzunehmen, dass die chemische Veränderung des QA sich im Wesentlichen auf die Struktur der pseudobinären Mischungen auswirkt.

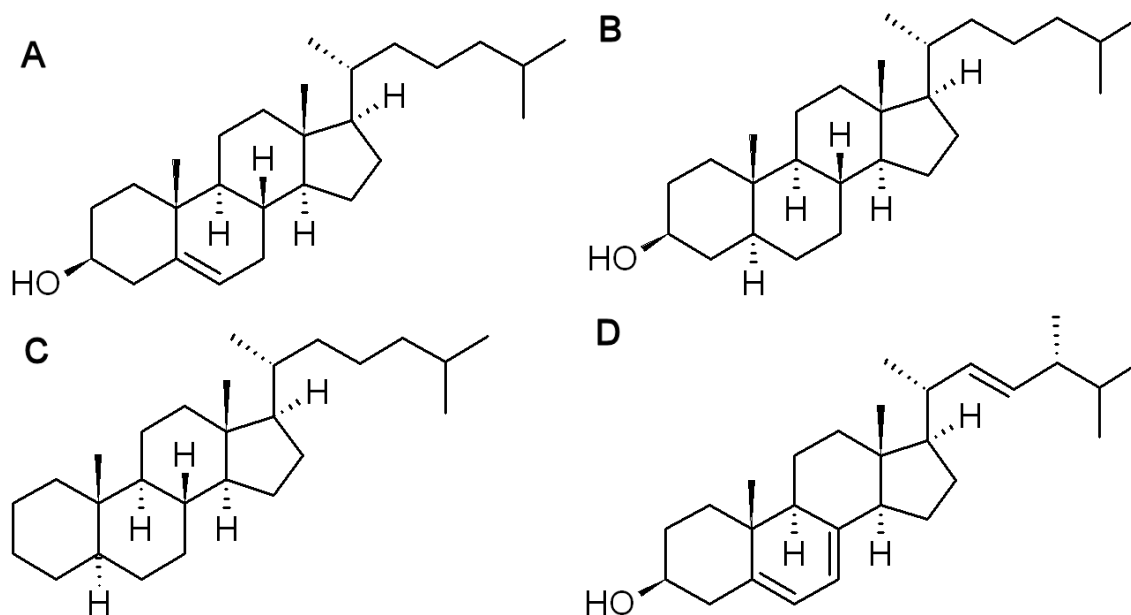


Abb. 4.38: Strukturformel von Cholesterol (A) und den Cholesterolderivaten: DHC (B), 5 α -Cholestan (C), Ergo (D)

Eine genauere Untersuchung der eventuellen Veränderungen erfordert eine chemische Analyse des QAs vor und nach Lagerung. Diese konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden.

4.3.3 Solubilisation von Cholesterolderivaten

Wie in den vorangegangenen Abschnitten gezeigt, interagiert Quil A mit Cholesterol. Um nähere Informationen über die essentiellen Strukturen für das Auswachsen der *wormlike micelles* zu erhalten, wurden Systeme mit einem Anteil von 35% eines Cholesterolderivates mit QA mittels Filmmethode hergestellt. Die eingesetzte QA-Charge entsprach der beim Hersteller gelagerten Charge B, deren Assoziate beim Zusatz von Chol zwar ein Wachstum zeigten, das jedoch nicht sehr stark ausgeprägt war (s. 4.3.2.8).

Die Strukturformeln der eingesetzten Derivate sind in Abbildung 4.38 dargestellt. Dihydrocholesterol (DHC) entspricht vom Aufbau Chol mit Ausnahme der hydrierten Doppelbindung im Ringsystem. Dieses hat eine Auswirkung auf die Konformation des Ringsystems. Während durch die Doppelbindung das Ringgerüst von Chol einen leichten Knick aufweist, besteht das hydrierte DHC aus einem ebenen Ringsystem.

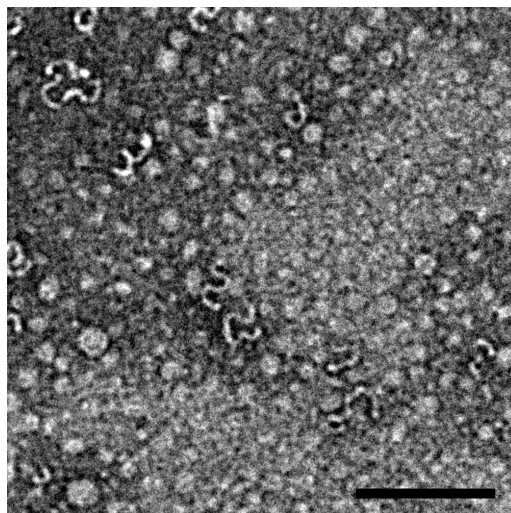


Abb. 4.39: TEM-Aufnahme von QA-Mizellen mit 35 % DHC (Balken: 100 nm).

Tab. 4.15: Helicale Parameter [nm] bestimmt mittels TEM von QA-Mizellen mit 35 % DHC bzw. Chol (DHC: $n=11$; Chol: $n=4$).

	helicaler	Durchmesser	Durchmesser
Derivat	Abstand	der Helix	des Zylinders
DHC	$14,8 \pm 2,8$	$11,1 \pm 1,8$	$4,2 \pm 0,7$
Chol	$15,9 \pm 1,2$	$12,6 \pm 2,7$	$3,6 \pm 0,2$

5α -Cholestan weist ebenfalls ein hydriertes und damit ebenes Ringsystem auf. Zusätzlich fehlt die Hydroxylgruppe, so dass es sich hier nicht mehr um ein amphiphiles Molekül handelt.

Ergosterol (Ergo) weist eine zweite Doppelbindung im Ringsystem auf. Die Folge ist ein deutlicher Knick im Ringsystem. Zusätzlich befindet sich im lipophilen Triterpenrest eine weitere Doppelbindung. Diese hat zur Folge, dass der Alkanrest verhältnismäßig voluminös wird.

4.3.3.1 TEM

Weder die Solubilisierung von 5α -Cholestan noch von Ergo resultieren in der Bildung nachweisbarer Aggregate. Lediglich mit DHC werden *wormlike micelles* ausgebildet. Analog zu Chol weisen sie eine helicale Überstruktur mit einer großen Flexibilität auf (Abb.: 4.39). Tabelle 4.15 zeigt die daraus ermittelten helicalen Parameter. Mit Ausnahme des Durchmessers des Zylinders, der etwas größer zu sein scheint, ergeben sich keine Unterschiede.

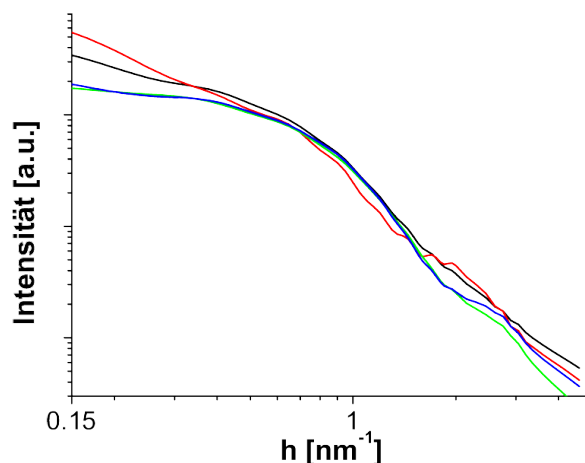


Abb. 4.40: entschmierte SAXS Streukurven der Formulierungen mit 35 % Cholesterolderivat (Schwarz: Chol; Rot: DHC; Blau: 5 α -Cholestan; Grün: Ergo) und 65 % QA.

4.3.3.2 SAXS

Abbildung 4.40 zeigt die erhaltenen Streukurven der unterschiedlichen Systeme nach der Entschmierung. Diese werden im Folgenden diskutiert.

DHC

DHC, das sich lediglich durch die fehlende Doppelbindung im Ringgerüst vom Cholesterol unterscheidet, bewirkt ein wesentlich ausgeprägteres Wachstum der Assoziate als Chol. Das Vorliegen eines ebenen Ringgerüsts scheint demnach für ein Auswachsen der Mizellen von Vorteil zu sein.

Eine naheliegende Interpretation ist eine verbesserte hydrophobe Wechselwirkung der Ringsysteme. Eine weitere Erklärung könnte jedoch auch eine verbesserte hydrophile Wechselwirkung der Hydroxylgruppe sein. Dies könnte der Fall sein, wenn die OH-Gruppe durch die geringfügig veränderte Konformation des Moleküls sterisch besser in der Lage ist, Wasserstoffbrücken zum Quil A auszubilden.

Auch die mit DHC gebildeten Assoziate weisen eine zusätzliche Überstruktur auf. Die Position des zusätzlichen Reflexes entspricht der Position bei Solubilisation von Cholesterol in QA. Dies ist im Einklang mit den TEM-Aufnahmen, die keinen Unterschied der helicalen Parameter zeigen.

5 α -Cholestan

Hier ist kein Anwachsen der Mizellen zu erkennen, sie sind wesentlich kleiner als mit Chol und DHC. Da auch hier das gleiche ebene Ringsystem wie bei DHC vorliegt,

kann dies nicht alleine für das mit DHC beobachtete starke Anwachsen der Mizellen verantwortlich sein.

Der Hydroxylgruppe kommt also wahrscheinlich eine bedeutende Funktion in der Stabilisierung der großen Assoziate zu. Frühere – auf rein elektronenmikroskopischen Bildern beruhende – Modelle der Interaktion zwischen Quil A und Chol sind im Wesentlichen von hydrophoben Wechselwirkungen ausgegangen [17]. Es zeigt sich hier jedoch, dass zumindest für die Ausbildung der *wormlike micelles* die hydrophile Hydroxygruppe eine wesentliche Rolle spielt. Mögliche Interaktionspartner für die Ausbildung von Wasserstoffbrücken sind aufgrund der Hydroxygruppen der Zuckerreste sowie der Säure- und der Aldehydfunktion der Quillajasäure ausreichend vorhanden.

Ergosterol

Auch eine Solubilisation von Ergosterol führt nicht zur Bildung großer *wormlike micelles*. Für diese Beobachtung gibt es wahrscheinlich zwei Gründe:

- das stark geknickte Ringgerüst behindert die gute hydrophobe Wechselwirkung der Ringgerüste
- der durch die Doppelbindung voluminöse Triterpenrest behindert sterisch die Anlagerung weiterer Moleküle.

4.3.4 Solubilisation von Cholesterol durch Dialyse

In den meisten Fällen werden ISCOMs über eine Dialyse hergestellt. Die Herstellung über die Solubilisation eines Phospholipid / Cholesterolfilms in einer mizellaren Quil A-Lösung, wie sie in den vorangegangenen Abschnitten durchgeführt wurde, hat sich bisher nicht durchsetzen können.

Bei der Dialysemethode wird Cholesterol in Phospholipid, Quil A und einem hydrophilen Emulgator (hier Mega-10) solubilisiert. Im Anschluss wird der hydrophile Emulgator durch Dialyse entfernt [102]. Wahrscheinlich sind Rückstände des zusätzlichen Emulgators in der resultierenden Formulierung verantwortlich dafür, dass die pseudobinären Mischungen weitere Strukturen ausbilden können, wie sie sowohl von Demana et al. als auch von Myschik et al. beobachtet wurden. Demana et al. beobachteten die Bildung von *ringlike micelles* bei einem Chol-Anteil von 20 %, die sich bei einer Erhöhung des Anteils an Chol (80 %) zu Lamellen zusammenlagerten [102].

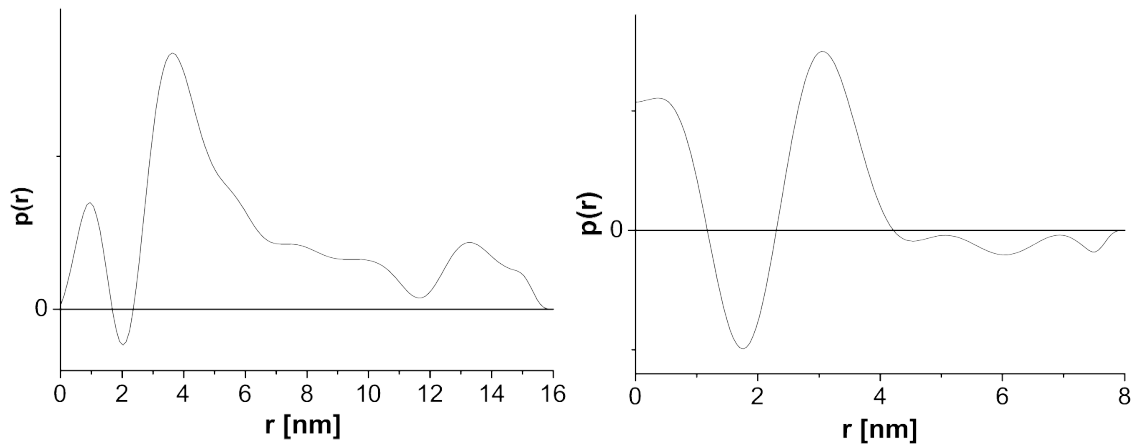


Abb. 4.41: PDDF einer mizellaren Mega-10-Lösung (100 mg/ml) in TRIS-Puffer (140mM, pH7,4)
Links: Kugelsymmetrie; Rechts: Zylindersymmetrie

Im Unterschied dazu konnten Myschik et al. das Vorliegen von Doppelhelices neben *ringlike micelles* beobachten (Chol-Anteil = 20 %). Die Erhöhung des Cholesterolanteils bewirkte auch hier die Zusammenlagerung der *ringlike micelles* zu Lamellen (33 %) [132]. In beiden Fällen wurde – im Gegensatz zu den hier untersuchten Proben – Octylglucosid als hydrophiler Emulgator eingesetzt.

4.3.4.1 SAXS

Mega-10

Um den Einfluss des Emulgators Mega-10 auf die Formulierung besser beurteilen zu können, wurde zunächst der Emulgator alleine untersucht. Die aus den Streukurven erhaltene PDDF bei Auswertung gemäß Kugelsymmetrie ist typisch für inhomogene zylinderförmige Aggregate [19]. Die Mizellen sind länger als mit der Kratky-Kamera bestimmt werden kann (Abb. 4.41).

Die Oszillation zu Beginn der Kurve stammt vom inhomogenen Querschnitt. Berechnet man die PDDF des Zylinderquerschnitts, erkennt man die typische Oszillation für inhomogene Querschnitte (hohe – niedrige – hohe Elektronendichte bzw. hohe – niedrige – hohe Wahrscheinlichkeit im Abstand r zwei Elektronen zu finden). Dabei gibt der dritte Nulldurchgang den Durchmesser der Mizelle an. Dieser liegt hier bei 4,2 nm. Bei der Auswertung gemäß Zylindersymmetrie geht das Modell von unendlich langen Stäbchen aus, was in der Realität nicht der Fall ist. Aus dieser Vereinfachung ergibt sich die hohe Wahrscheinlichkeit bei $r = 0$ als Artefakt [19]. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen von Littrell et al., die mittels SANS-Untersuchungen zylinderförmige Assoziante fanden. Für eine Lösung von 10 mg/ml

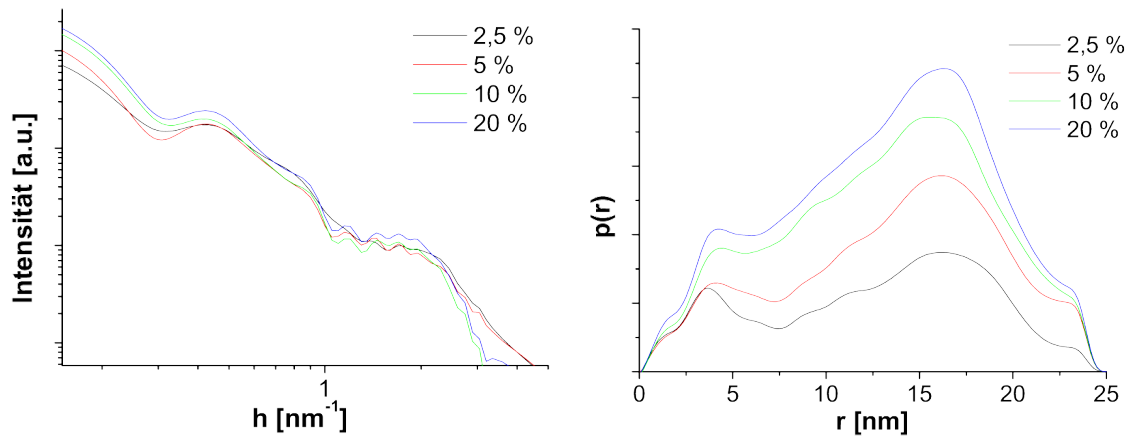


Abb. 4.42: entschmierte Streukurven (links) und PDDF nach Kugelsymmetrie (rechts) von 2.5% Chol (Schwarz) und 5% Chol (Rot) solubilisiert in Quil A-Mizellen über Dialyse mit Mega-10.

Tab. 4.16: Steigung der entschmierten Streukurven im Power-Plot.

Chol-Anteil [%]	2,5	5	10	20
Steigung	-1,75	-2,13	-1,95	-1,96

weisen sie einen Durchmesser von 2,69 nm und eine Länge von 85,3 nm nach [133]. Der Durchmesser ist wesentlich kleiner als hier bestimmt. Dies kann analog den *wormlike micelles* durch den unterschiedlichen Kontrast, der der Streuung zugrunde liegt, begründet werden (s. Abschnitt 4.3.2.6). Des Weiteren ist die Konzentration bei Littrel et al. wesentlich geringer als in der vorliegenden Arbeit

Quil A / Chol

Abbildung 4.42 zeigt die entschmierten Streukurven der pseudobinären Systeme Chol / QA, die mittels Dialyse mit Mega-10 als hydrophilem Emulgator hergestellt wurden. Ein Guinierverhalten ist nicht zu erkennen. Die Partikel sind also zu groß, um als Ganzes aufgelöst zu werden. Daher kann geschlossen werden, dass *ringlike micelles* zumindest nicht als alleinige Struktur in der Formulierung vorliegen, denn aufgrund der verhältnismäßig kleinen Größe hätten *ringlike micelles* als Ganzes aufgelöst werden müssen. Für eine weitere Interpretation kann die Steigung bei den kleinsten Winkeln im Power-Plot herangezogen werden (Tab. 4.16). Wie bereits erwähnt, spricht eine Proportionalität von $h^{-1,67}$ für das Vorliegen flexibler *wormlike micelles*. Eine Proportionalität von h^{-2} hingegen entsteht durch das Vorliegen planarer Systeme [134]. *Ringlike micelles*, die sich zu einer Lamelle zusammengelagert haben, weisen entsprechende planare Strukturen auf. Das System scheint sich al-

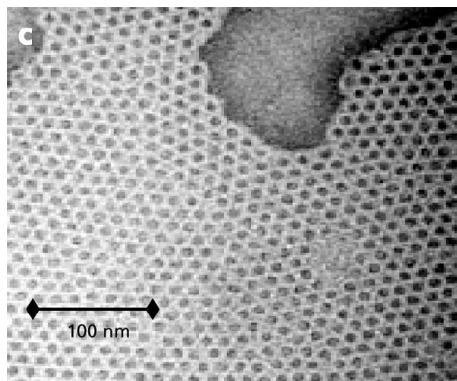


Abb. 4.43: TEM-Aufnahmen zusammengelagerter Ringe (QA : Chol: 1:4; Gesamtkonzentration = 6,7 mg/ml [102]).

so bei Erhöhung des Chol-Anteils von zylinderartigen – also *wormlike micelles* bei 2,5 % Chol – zu lamellaren Strukturen (ab 5 % Chol) zu verändern (Tab. 4.16).

Auch die hier vermessenen Streukurven weisen einen zusätzlichen Reflex bei ca. $0,4 \text{ nm}^{-1}$ auf. Bei 2,5 % Chol-Anteil ist dieser vermutlich auf das Vorliegen einer helicalen Überstruktur der *wormlike micelles* zu erklären. Wobei auch evtl. neben den Würmern vorliegende *ringlike micelles* die Bildung eines entsprechenden Reflexes bewirken. Steigt der Chol-Anteil, könnte es, wie in der Literatur beschrieben, zur Zusammenlagerung der Ringe kommen (Abb. 4.43). In diesem Fall entsteht der Reflex durch die periodische Struktur innerhalb der Lamelle. Es ist auffällig, dass die Position des Reflexes unabhängig vom Chol-Anteil ist. Entsprechend verhält es sich mit der Position des daraus resultierenden Maximums in der PDDF, das bei etwa 16 nm zu finden ist.

Eine weitere Abweichung der Systeme nach Dialyse ist in der resultierenden PDDF zu erkennen. Hier steigt die linke Flanke des ersten Maximums nicht gleichmäßig an. Dies ist auf eine inhomogene Elektronendichte im Zylinderquerschnitt bzw. bei lamellaren Strukturen entlang der Linie senkrecht durch die Lamelle zurückzuführen. Der Elektronendichteunterschied zwischen hydrophiler Hülle und lipophilem Kern ist hier wesentlich stärker ausgeprägt als in den *wormlike micelles*, die nach der Filmmethode hergestellt wurden. Eine exakte Auswertung der PDDF des Zylinderquerschnitts / der Linie senkrecht durch die Lamelle, ist jedoch aufgrund der Überlagerung der Informationen nicht möglich.

Der stärkere Elektronendichteunterschied zwischen Hülle und Kern des Zylinders ist ein weiteres Indiz für Rückstände von Mega-10 in den Mizellen. Wie an den PDDF der reinen Mega-10 Mizellen zu erkennen ist, weisen diese einen großen Elektronendichteunterschied auf (Abb.: 4.41). In den pseudobinären Systemen könnte die Inhomogenität durch Rückstände von Mega-10 erhöht werden (Abb.: 4.42). Zusätz-

lich ändern die Rückstände des zusätzlichen Emulgators die Struktur der *wormlike micelles* in komplexere Systeme.

Eine weitere Erklärung für die ausgeprägte Inhomogenität der Zylinderquerschnitte könnte eine geringere Polydispersität der Systeme darstellen. Liegen *ringlike micelles* anstelle von *wormlike micelles* vor, so weisen sie eine wesentlich besser definierte Größe auf, da es keine unterschiedlich langen Assoziate gibt. Wie in Abschnitt 4.3.2.5 diskutiert, führt jedoch eine solche Polydispersität bei helicalen Systemen zu Veränderungen der Streukurve im Bereich des Zylinderquerschnitts und könnte damit für eine Verschmierung der Information über den inhomogenen Querschnitt führen.

Da zu wenig Material für die zusätzliche Aufnahme von TEM-Bildern vorlag, können diese Beobachtungen jedoch lediglich als Indiz gewertet werden. Die Beobachtungen entsprechen in etwa den Literaturdaten an einem ähnlichen System. Es ergeben sich jedoch Abweichungen in Bezug auf die Konzentrationsverhältnisse. Bei Verwendung von Octylglucosid konnte in keinem Fall bei einem Chol-Anteil von 20 % elektronenmikroskopisch die Bildung von zusammengelagerten *ringlike micelles* nachgewiesen werden. Diese wurden erst bei höheren Chol-Anteilen gebildet [102, 132].

4.3.5 Liposomen und Quil A

ISCOMs werden – bei Herstellung mittels Filmmethode – erst in einer pseudoternären Mischung von Quil A, Phospholipid und Cholesterol gebildet [18]. Die heterogenen Mischungen sind für Messmethoden wie die Röntgenstreuung nur schwer auswertbar. Aus diesem Grund wurde hier lediglich der Einfluss eines QA-Zusatzes auf Liposomen mit unterschiedlichem Gehalt an Cholesterol beurteilt. Dazu wurden zunächst Liposomen mit unterschiedlichem Verhältnis Cholesterol zu P100 nach der Filmmethode hergestellt. Erst nach erfolgter Rehydratisierung der Liposomen wurde QA zugesetzt, um den Einbau des QA in den Bilayer über die Zeit beobachten zu können.

4.3.5.1 PCS

Die Chol-freien Liposomen weisen nach der Beschallung und vor der Zugabe von QA einen *zAverage* von etwa 100 nm auf. Eine Zugabe von QA bewirkt eine rasche Agglomeration der Partikel. Die Agglomeration erfolgt umso schneller, je mehr QA im Verhältnis zum Lecithin vorhanden ist (Abb: 4.44). Ab einem QA-Anteil von 50 % wurde während der Bestimmung die Bildung eines Sediments beobachtet.

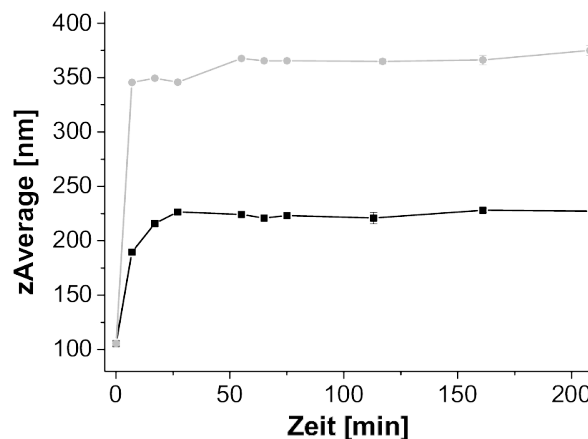


Abb. 4.44: *zAverage* der Chol freien Liposomen nach QA Zugabe unterschiedlicher Anteile QA in Abhängigkeit von der Zeit (resultierender QA-Anteil: 25 % (schwarz); 50 % (grau) – Gesamtkonzentration: 50 mg/ml) ($n=3$).

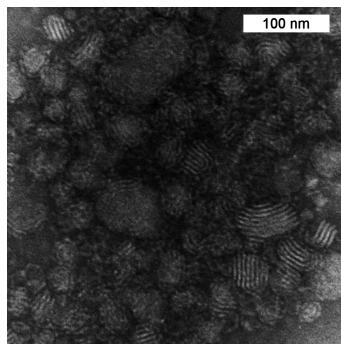


Abb. 4.45: gestapelte Strukturen mit 65 % Quil A, 35 % P100 und 0 % Chol (Gesamtkonzentration: 6,7 mg/ml).

Ein Anteil von 60 % QA bewirkt eine so schnelle Agglomeration, dass eine zeitabhängige Messung der Partikelgrößenänderung nicht mehr möglich ist.

4.3.5.2 TEM

Das in Abbildung 4.45 dargestellte System weist gestapelte Strukturen auf. Dies ist sowohl typisch für Cholesterol / Lecithin-Systeme als auch reine Lecithin-Systeme, die zusätzlich QA enthalten (Abb.: 4.1) [18]. Auffällig ist die Agglomeration der geschichteten Strukturen, wobei diese eine lediglich geringe Anzahl an Lamellen aufweisen. Vergleicht man dies mit den TEM-Aufnahmen von Demana et al., so ist bei ihnen keine derartige Agglomeration zu erkennen [18].

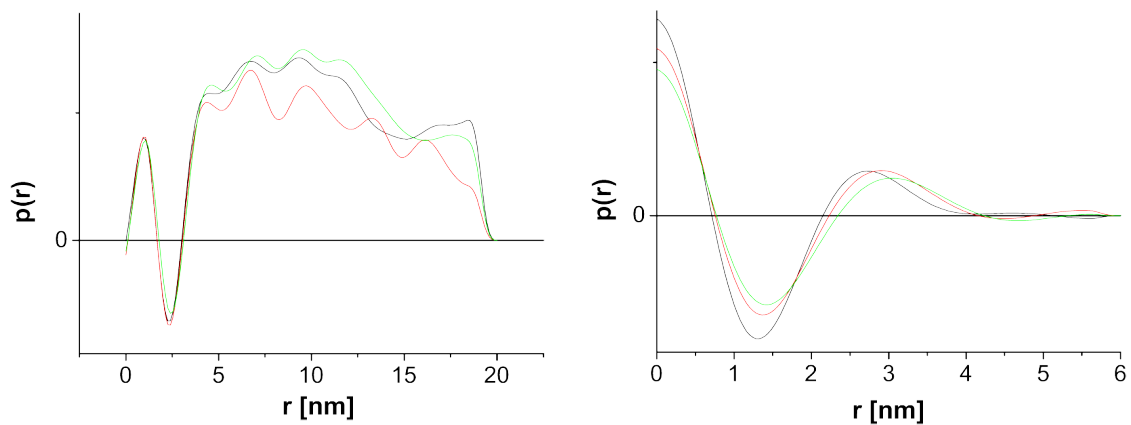


Abb. 4.46: PDDF der Liposomen aus P100 mit 0 % Chol (schwarz), 1 % Chol (rot) und 10 % Chol (grün). Auswertung gemäß Kugelsymmetrie (links) und Blättchensymmetrie (rechts). (Gesamtkonzentration: 50 mg/ml)

Tab. 4.17: Dicke der Bilayer vor bzw. nach QA-Zugabe [nm].

Chol-Anteil	vorher	nachher
0	4,0	4,5
1	4,2	nicht vermessen
10	4,2	4,7

4.3.5.3 SAXS

Zunächst wurden die Streukurven der reinen Liposomen vor QA-Zusatz untersucht. Die erhaltenen PDDF nach Auswertung gemäß Kugelsymmetrie sind typisch für Liposomen (Abb.: 4.46). Die Oszillation bei kleinen Abständen r stammt von der inhomogenen Liposomenhülle (hohe – niedrige – hohe Elektronendichte bzw. hydrophil – lipophil – hydrophil), der folgende starke Anstieg der PDDF ist ebenfalls typisch für Liposomen [19].

Betrachtet man die PDDF, die bei Auswertung gemäß Blättchensymmetrie erhalten wurde und die die Wahrscheinlichkeit angibt, Elektronen im Abstand r auf einer Linie senkrecht durch den Bilayer zu finden, wird der oben beschriebene inhomogene Aufbau deutlich. Aus dem dritten Nulldurchgang kann die Dicke des Bilayers abgelesen werden. Bereits ein Anteil von 1 % Cholesterol bewirkt eine leichte Zunahme der Bilayerdicke von 4,0 nm auf 4,2 nm. Eine weitere Erhöhung des Anteils auf 10 % bewirkt keine Änderung (Tab.: 4.17).

Wird QA zugesetzt, kommt es im System ohne und mit 10 % Chol sofort zu einer weiteren Zunahme der Bilayerdicke um ca. 0,5 nm auf 4,5 bzw. 4,7 nm. Die Dicke des Bilayers ändert sich nicht mehr über die Zeit (30 h). Diese Beobachtung bestätigt

isokalorimetrische Messungen, die einen raschen Einbau des QA in die Liposomen nahelegen [131].

Die Anzahl der gebildeten Lamellen reicht nicht für die Ausbildung eines Bragg-Reflexes. Dies entspricht den TEM-Aufnahmen, die eine geringe Anzahl an Lamellen nahelegen. Gleichzeitig ist makroskopisch eine Agglomeration der Partikel zu erkennen, da es zur Bildung eines Sediments in der Kapillare kommt. Dies macht die zeitabhängigen Messungen nach einiger Zeit unmöglich.

4.3.6 Pseudoternäre Mischungen und ISCOM-Matrices

Pseudoternäre Mischungen wurden ebenfalls mittels SAXS und SANS untersucht. Da in den pseudoternären Mischungen die unterschiedlichen mizellaren Assoziante in Form von ISCOM-Matrices, *ringlike micelles*, *wormlike micelles* mit helicaler Überstruktur und gestapelten Strukturen coexistieren, waren die resultierenden Systeme zu heterodispers, um ausgewertet werden zu können.

Theoretisch denkbar ist eine Aufreinigung mittels Zentrifugation im Dichtegradienten, die zur Isolierung der ISCOMs angewendet wird [132]. Dies wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, da ein Problem, das diese Methode in Bezug auf Streuexperimente mit sich bringt, eine Änderung des Kontrastes des Lösungsmittels ist. Grund für die Änderung des Kontrastes ist die nach der Verdünnung im Lösungsmittel enthaltene Restkonzentration an Zucker, der die Elektronendichte stark beeinflusst. Ohne die Kenntnis einer exakten Zuckerkonzentration kann dementsprechend keine exakte Lösungsmittelstreucurve aufgenommen werden.

Um diese Bestimmungen durchführen zu können, müsste zunächst eine Methode zur Bestimmung des Zuckergehaltes neben den Zuckern des Quil A und den weiteren Bestandteilen etabliert werden, was jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde.

Die oben dargestellte Problematik bezüglich der nicht exakt bekannten Zuckerkonzentration spielt in Bezug auf SANS-Untersuchungen lediglich eine untergeordnete Rolle, da hier nicht der Elektronendichteunterschied sondern der Kontrast zwischen Wasserstoff- und Deuteriumatomen relevant ist. Dieser wird durch Zucker nicht so stark beeinflusst. Derartige Untersuchungen waren jedoch aus Zeitgründen nicht möglich.

4.4 Abschlusssdiskussion

Ursprüngliches Ziel dieses Teils der Arbeit sollte ein Einblick in den Aufbau von ISCOM-Matrices sein. Da der Aufbau dieser Systeme sehr komplex ist – da sie zusätzliche Strukturen wie *ringlike micelles*, *wormlike micelles* und gestapelte Strukturen enthalten [18] – erwies sich die direkte Untersuchung der ISCOM-Matrices als nicht realisierbar. Aus diesem Grund wurden im Wesentlichen die Interaktionen von Quil A mit den weiteren an der Bildung der ISCOMs beteiligten Stoffen (Cholesterol und Lecithin) getrennt voneinander untersucht.

Quil A ist ein aufgereinigtes Naturstoffgemisch. Aus diesem Grund wurde zusätzlich der Einfluss von Verunreinigungen durch den Einsatz unterschiedlich stark aufgereinigter Extrakte (QA und XQA) untersucht. Weitere Ergebnisse beziehen sich auf die Lagerstabilität.

4.4.1 Interaktion von Quil A mit Cholesterol

Die pseudobinären Systeme Quil A und Cholesterol in TRIS-Puffer bilden *wormlike micelles*. Sie erfahren mit zunehmendem Anteil an Chol ein eindimensionales Wachstum. Der Aufbau der Würmer besteht dabei laut Kersten et al. aus übereinander gestapelten Quil A- und Cholesterolringgerüsten, die im Wesentlichen durch hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehalten werden [17].

TEM-Aufnahmen legen die Bildung einer helicalen Überstruktur dieser Systeme nahe. Eine solche Überstruktur wird häufig für die pseudoternären Systeme [18, 102], nicht aber für die pseudobinären Systeme ohne Phospholipid beschrieben. Dennoch lassen die entsprechenden TEM-Aufnahmen ebenfalls eine derartige Überstruktur erkennen. Sie ist jedoch in Abwesenheit von Phospholipid weniger deutlich ausgeprägt [18].

Auf die Existenz einer Überstruktur weisen auch die SANS und SAXS Untersuchungen hin, da die typischen Streukurven eines Zylinders einen zusätzlichen Reflex aufweisen. Gründe für die Ausbildung eines Reflexes sind periodische Strukturen, die jedoch nicht unbedingt helicaler Natur sein müssen. Periodische Strukturen können ebenfalls in folgenden Überstrukturen zylindrischer Aggregate vorliegen:

Inhomogenitäten entlang der Achse: durch unterschiedlich voluminöse Zuckerreste an beiden Seiten des Quil A kann die Dicke des Zylinders entlang der

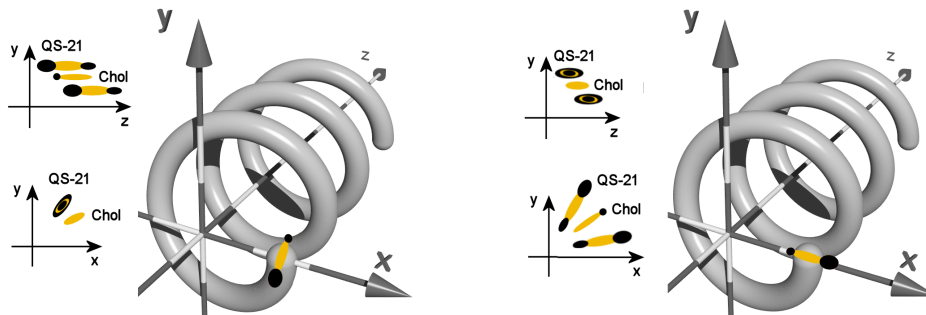


Abb. 4.47: Modellvorschlag für den Aufbau der Helix. Links: Lage des QA bei Verkipfung durch die sterische Behinderung der Methylgruppen. Rechts: Lage des QA bei einer Verkipfung durch die sterische Behinderung der Zuckerreste.

Achse periodisch variieren. Diese Periodizitäten können zur Bildung eines Reflexes führen. Da hierfür jedoch regelmäßig mehrere Moleküle ähnlicher Größe hintereinander gestapelt werden müssten, ist dieser Aufbau unwahrscheinlich.

Verdrilltes Band: Die Grundfläche der Quil A-Moleküle ist elliptisch. Lagert sich das nächste Molekül um einen bestimmten Winkel verdreht an, kommt es zu einer Rotation des Moleküls um die Zylinderachse und damit zu einem verdrillten Band. Die von einer derartigen Struktur gebildete PDDF weist jedoch kein derart ausgeprägtes Maximum auf.

Das Vorliegen einer helicalen Überstruktur ist also am wahrscheinlichsten und ist im Einklang mit den SANS und SAXS-Messungen.

Fit-Versuche an die SANS-Streukurven der QA-Mizellen mit Cholesterol mittels eines helicalen analytischen Modells waren jedoch nicht möglich. Der Grund liegt wahrscheinlich darin, dass das Modell als Vereinfachung vom Vorliegen unendlich langer Helices ausgeht. Ein Fit ist lediglich an die reinen XQA-Mizellen möglich, die laut PCS sehr große Assoziate darstellen.

Für Cholesterol oder Quillaja-Saponin sind in der Literatur bereits in einem anderen Zusammenhang helicale Strukturen beschrieben. So entstehen bei der Selbstaggregation von Cholesterol aus gesättigten Gallensalzlösungen in Gegenwart von Phospholipiden als Zwischenstufe helicale Bänder. Ihre Größe liegt jedoch im Mikrometerbereich [126, 127]. Auch Quillaja-Saponin zeigt mit Gallensalz die Bildung helicaler *wormlike micelles* [104].

4.4.1.1 Modellvorschläge für die Bildung der Helix

Es stellt sich die Frage eines Modells für die Ursache des helicalen Aufbaus. Geht man von den oben beschriebenen Mizellen – die aus aufeinandergestapelten Quil A- und

Cholesterolemolekülen bestehen – aus, so kann eine Helix nur durch eine Verkippung der Ringgerüste in der xy-Ebene um einen definierten Winkel entstehen. Damit diese Verkippung nicht zum Ringschluss führt, muss zusätzlich in z-Richtung ein Versatz der Moleküle erfolgen (Abb. 4.47). Im Folgenden werden zwei Möglichkeiten für das Entstehen einer Verkippung diskutiert:

- Molecular Modelling zeigt, dass die Anlagerung von Cholesterol an QS-21 nicht planar erfolgt. Aufgrund der senkrecht zum Ringgerüst stehenden Methylgruppen ergibt sich ein Verkippungswinkel von etwa 35° zwischen den beiden Molekülen (Abb.: 4.47 links).
- Eine weitere Möglichkeit ergibt sich aus den unterschiedlich großen Zuckerresten, die sterisch einen Neigungswinkel zwischen den Ringgerüsten erzwingen können (Abb.: 4.47 rechts).

Die TEM-Aufnahmen dieser Arbeit zeigen im Einklang mit Beobachtungen von Rades [125], dass der Durchmesser der Helix relativ wenig von äußeren Einflüssen verändert wird. Dies könnte als Indiz für das erste Modell (Abb.: 4.47 links) gewertet werden. Da hier die Verkippung der Ringgerüste durch die unterschiedlichen Reste – zum Beispiel bei QA und XQA – praktisch nicht beeinflusst werden dürfte. Änderungen der Reste müssten jedoch einen Einfluss auf das zweite Modell (Abb.: 4.47 rechts) haben.

Der helicale Abstand ergibt sich, indem die Moleküle in z-Richtung um eine definierte Strecke versetzt an das vorherige Molekül angelagert werden. Die Zusammenlagerung von Chol und QS-21 mittels Molecular Modelling zeigt einen solchen Versatz der Ringe gegeneinander. Dieser könnte im Zusammenspiel mit der Verkippung der Moleküle zur Bildung einer helicalen Struktur führen.

TEM-Aufnahmen legen die Bildung von zwei Kollektiven mit unterschiedlich großem helicalen Abstand nahe. Eine mögliche Erklärung könnte in hydrophilen Wechselwirkungen liegen. Liegen die Zuckerketten in z-Richtung wie in Abb. 4.47 (links), können sie Wasserstoffbrückenbindungen untereinander ausbilden. Damit könnten sie für einen geringeren helicalen Abstand sorgen, in dem sie die Ketten „zusammenhalten“ (Abb.: 4.48 links). Steigt der Chol-Anteil, befinden sich weniger Zuckerketten in der Mizelle, wodurch weniger hydrophile Wechselwirkungen für einen Zusammenhalt zwischen den Ringen vorhanden sind, was zum „Auseinanderspringen“ der Helix führen könnte (Abb.: 4.48 rechts).

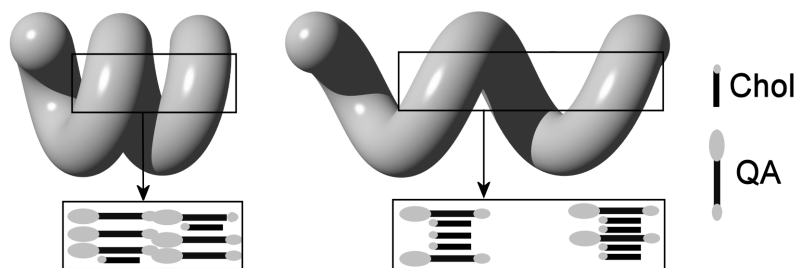


Abb. 4.48: Modell für den Zusammenhalt der Helix-Segmente durch hydrophile Wechselwirkungen (hoher QA-Anteil: links, niedriger QA-Anteil: rechts).

4.4.1.2 Interaktion von Quil A mit Cholesterolderivaten

SAXS und TEM zeigen, dass strukturelle Veränderungen am Cholesterolmolekül zu einer Änderung der *wormlike micelles* führen. Die Hydrierung der Doppelbindung des Cholesterols führt zu einer verstärkten Längenzunahme der Zylinder (DHC). Ein ebenes Ringgerüst scheint also im Gegensatz zum leicht geknickten Ringgerüst des Cholesterols für die Bildung der *wormlike micelles* von Vorteil zu sein.

Wird jedoch zusätzlich die Hydroxylgruppe entfernt, resultieren lediglich kurze Assoziate (5 α -Cholestan). Dies legt nahe, dass die Hydroxygruppe für die Bildung der *wormlike micelles* – wahrscheinlich durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung – essentiell ist. Eine Interaktion in Form einer Wasserstoffbrückenbindung zur Fucose wird auch durch Molecular Modelling bestätigt.

Ergosterol weist – aufgrund zusätzlicher Doppelbindungen – ein stärker geknicktes Ringgerüst sowie einen voluminöseren lipophilen Rest als Cholesterol auf. Dies führt ebenfalls zur Bildung kurzer Assoziate. Mögliche Ursachen sind: eine verminderte hydrophobe Wechselwirkung auf Grund des stärker geknickten Ringgerüsts und/oder eine sterische Behinderung der Zusammenlagerung durch den voluminöseren lipophilen Rest.

4.4.1.3 Einfluss von Verunreinigungen

XQA ist ein stärker aufgereinigtes Quil A als QA. Vergleicht man für die unterschiedlich gereinigten Saponintypen die Streukurven mittels SANS und SAXS der Chol-freien Mizellen sowie die mittels PCS bestimmten Partikelgrößen, so ist zu erkennen, dass XQA die größeren Assoziate bildet. Geht man erneut davon aus, dass sich Quil A und Cholesterol mit den Ringgerüsten übereinander stapeln, so müssen die lipophilen Ringgerüste an den Seiten der Stapel mit Wasser in Kontakt treten. In der Formulierung enthaltene amphiphile und lipophile Verunreinigungen können

sich dementsprechend dort anlagern. Eine weitere Anlagerung eines Ringgerüsts ist damit nicht mehr so gut möglich. Die Kette bricht ab (Abb.: 4.14).

Diese Eigenschaft könnte eventuell auch das Ausbleiben des Auswachsens lang gestreckter *wormlike micelles* nach Lagerung des Quil A erklären. Verunreinigungen, die während der Lagerung entstanden sein könnten, können sich an die Enden der Aggregate anlagern und so eine weitere Längenzunahme der Zylinder verhindern. Zusätzlich kommt dazu, dass aufgrund der Veränderung die amphiphilen Eigenschaften des QA herabgesetzt sein können und damit die Fähigkeit Cholesterol zu solubilisieren.

Im Gegensatz dazu bewirkt eine wahrscheinlich in die Mizellen inkorporierte Verunreinigung durch den hydrophilen Emulgator Mega-10 eine wesentlich stärkere Ausbildung einer Überstruktur. Für ein entsprechendes System mit einem anderen hydrophilen Emulgator (Octylglucosid) wurde die Bildung von *ringlike micelles* neben *wormlike micelles* und Doppelhelices beschrieben [102, 132]. Aufgrund der Literatur sowie den SAXS-Untersuchungen wird vermutet, dass sich hier zunächst eine helicale Struktur ausbildet. Aus dieser könnten bei höheren Chol-Anteilen *ringlike micelles* entstehen, die sich zu Lamellen zusammenlagern.

4.4.2 Interaktion von Quil A mit Liposomen

Ein Zusatz von Quil A zu Liposomen führt zur Ausbildung gestapelter Strukturen [18]. TEM-Aufnahmen bestätigen diese Beobachtung. Die Aufnahmen legen eine Agglomeration der Partikel nahe, wobei die Agglomerate aus lamellaren Strukturen mit einer geringen Anzahl an Schichten bestehen. Die Agglomeration der Partikel kann ebenfalls makroskopisch und mittels PCS nachgewiesen werden. SAXS bestätigt das Vorliegen von Blättchen, wobei keine Ausbildung eines Reflexes beobachtet werden kann, wie es für multilamellare Liposomen der Fall ist [135]. Eine Begründung für dieses Phänomen liefert die geringe Anzahl lamellarer Schichten in den gestapelten Strukturen. Diese reichen anscheinend nicht für die Ausbildung eines Bragg-Reflexes. Sowohl SAXS als auch PCS zeigen, dass die Veränderung der Liposomen rasch nach Zugabe des Quil A erfolgt.

Der mittels SAXS ermittelte Anstieg der Bilayerdicke kann nur durch den Einbau des QA in einen Monolayer erklärt werden. Würde es aufgrund der bolaamphiphilen Struktur in den gesamten Bilayer inkorporiert werden, käme es durch die kürzere Länge der Quil A-Moleküle zu einer Einschnürung des Bilayers an dieser Stelle. Als Folge würde ein dünnerer Bilayer bestimmt werden (Abb. 4.49).



Abb. 4.49: Denkbare Einlagerung von QA in den Bilayer. Links: Einbau in einen Monolayer; Rechts: Einbau in beide Layer.

Eine nähere Betrachtung der geschichteten Strukturen im TEM zeigt, dass diese lediglich einen geringen Krümmungsradius aufweisen. Dies liefert einen Erklärungsansatz für die Zerstörung der liposomalen Struktur durch QA. Der Einbau des QA bewirkt die Bildung eines Bilayers mit einem geringeren Krümmungsradius, so dass die bereits vorliegenden Liposomen „zerrissen“ werden. Die entstehenden Bilayerfragmente lagern sich anschließend zu den beobachteten Agglomeraten zusammen. Die treibende Kraft der Agglomeration ist nicht bekannt.

4.4.3 Interaktion von Quil A mit Phospholipid

Es ist auffällig, dass eine Interaktion von Quil A mit Phospholipid (in Gegenwart von Chol) bevorzugt zur Bildung ebener Strukturen zu führen scheint. Eine Einarbeitung in die *wormlike micelles* bewirkt, dass die zunächst helicale Überstruktur in eine planare Form, die *ringlike micelles*, überführt wird. Neben den *ringlike micelles* entstehen *wormlike micelles* mit einem wesentlich geringeren helicalen Abstand. Sie nähern sich also ebenfalls einem planaren Ringsystem an. Diese Beobachtungen, legen den Schluss nahe, dass Phospholipid den Versatz, der die Bildung der Helix bewirkt, aufhebt. Die Folge ist die Bildung ringförmiger Strukturen.

Die Beobachtung, dass Phospholipid zusammen mit Chol bevorzugt planare Strukturen ausbildet, trifft auch auf die zuvor beschriebenen Wechselwirkungen mit Liposomen zu (Abschnitt: 4.4.2, sowohl mit als auch ohne Chol).

4.5 Zusammenfassung

Ziel dieses Teils der Arbeit war eine Untersuchung des Aufbaus von Quil A-Assoziaten. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Solubilisation von Cholesterol in Quil A.

TEM legt eine helicale Überstruktur der sich bildenden *wormlike micelles* nahe. SANS und SAXS-Messungen bestätigen das Vorliegen einer Überstruktur, die wahrscheinlich helicaler Natur ist.

Anhand der durchgeführten Untersuchungen konnte eine Modellvorstellung für die Bildung der Helix aufgestellt werden. Der Modellvorstellung wurde zugrundegelegt, dass die Mizellbildung durch ein Aufeinanderstapeln von Quil A und Cholesterol-Ringgerüsten erfolgt. Mittels Molecular Modelling konnte folgendes Modell erstellt werden:

1. Der Zusammenhalt der Mizelle erfolgt wahrscheinlich über hydrophobe Wechselwirkungen der Ringgerüste, aber auch eine hydrophile Wechselwirkung in Form einer Wasserstoffbrücke von Chol zu Quil A.
2. Eine mögliche Ursache für die Bildung der Helix-Struktur ist eine Verkipfung der Ringgerüste gegeneinander.

Des Weiteren wurde der Einfluss von Verunreinigungen auf die gebildeten Assoziate beurteilt. Hier zeigte sich, dass Verunreinigungen zu einem Kettenabbruch der *wormlike micelles* führen.

Der Einbau von Quil A in Liposomen führte zur Bildung von geschichteten Strukturen und Aggregation der zuvor kleinen Partikel.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Röntgen- und Neutronenstreuung für die Untersuchung kolloidaler Arzneiformen eingesetzt werden. Als Beispielsysteme wurden ein nanopartikuläres (oberflächenmodifizierte Lipidnanopartikel) und ein mizellares System (Quil A-Assoziat) verwendet.

In beiden Fällen konnten wertvolle Informationen mit Hilfe dieser Methoden gewonnen werden. So konnte sowohl Röntgenkleinwinkelstreuung als auch -beugung zur Strukturaufklärung der Lipidnanopartikel beitragen. Mittels Röntgenkleinwinkelbeugung konnte die α -Modifikation des Hartfetts von der β - und β' -Modifikation unterschieden werden. Diese Untersuchung konnte an den Lipidmatrices ebenso durchgeführt werden wie an den Nanosuspensionen. Die Röntgenkleinwinkelstreuung nach Zentrifugation der Nanosuspensionen zeigte, dass keine zusätzlichen kolloidalen Partikel neben den Lipidnanopartikeln gebildet wurden. Zusätzlich wurde diese Methode eingesetzt, um den Aufbau der von Solutol mit Lecithin möglicherweise in den Nanosuspensionen gebildeten Mischassoziate aufzuklären. Diese wiesen einen mizellaren (geringer Lecithinanteil) oder liposomalen (hoher Lecithinanteil) Aufbau auf.

Für die Quil A-Assoziat lieferten sowohl Röntgen- als auch Neutronenkleinwinkelstreuung einen Hauptteil der Ergebnisse. Die erhaltenen Streukurven konnten wichtige Hinweise für die Identifizierung einer helicalen Überstruktur der *wormlike micelles* geben. Des Weiteren konnte mittels dieser Methoden der Einfluss von Stoffen wie Cholesterol, Cholesterolderivaten und Verunreinigungen auf die Quil A Mizellen beurteilt werden. Als problematisch für die Kleinwinkelstreuung stellte sich in diesem System jedoch die Polydispersität der Systeme dar. Aufgrund dieser Polydispersität konnten die Ergebnisse lediglich qualitativ beurteilt werden.

Abschließend kann gesagt werden, dass sowohl Röntgen- als auch Neutronenkleinwinkelstreuung ein sehr mächtiges Hilfsmittel in der Charakterisierung kolloidaler Arzneiformen darstellen. Um die Ergebnisse abzusichern und die Interpretation zu erleichtern, ist jedoch eine Kombination mit anderen Untersuchungsmethoden zwingend erforderlich.

Literaturverzeichnis

- [1] UNRUH, T.; BUNJES, H.; WESTESEN, K. ; KOCH, M.H.J.: Observation of Size-Dependent Melting in Lipid Nanoparticles. In: *Journal of Physical Chemistry B* 103 (1999), Nr. 47, 10373–10377
- [2] MÜLLER, R.H. ; LUCKS, J.S.: *Dispersions of solid lipid nanospheres as sustained-release drug carriers*. 1994. – Patent No.: DE 4131562 A1 199303252
- [3] MÜLLER, R.H.; MÄDER, K. ; GOHLA, S.: Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50 (2000), 161–177
- [4] ZUR MÜHLEN, A.; SCHWARZ, C. ; MEHNERT, W.: Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - Drug release and release mechanism. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 45 (1998), Nr. 2, 149–155
- [5] WESTESEN, K.; BUNJES, H. ; KOCH, M.H.J.: Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. In: *Journal of Controlled Release* 48 (1997), Nr. 2-3, 223–236
- [6] FRIEDRICH, I. ; MÜLLER-GOYMANN, C.C.: Characterization of solidified reverse micellar solutions (SRMS) and production development of SRMS-based nanosuspensions. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 56 (2003), 111–119
- [7] FRIEDRICH, I. ; MÜLLER-GOYMANN, C.C.: Hydrocortisone loaded nanosuspensions based on solidified reverse micellar solutions (SRMS). In: *Proceedings of the International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Nuremberg, March 15-18, 2004*, 437–438

- [8] SCHUBERT, M.A. ; MÜLLER-GOYMANN, C.C.: In vitro evaluation of the cytotoxicity of colloidal lipid suspensions (CLS) based on solidified reverse micellar solutions (SRMS). In: *Proceedings of the International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Nuremberg, March 15-18, 2004*, 759–760
- [9] SCHUBERT, M.A. ; MÜLLER-GOYMANN, C.C.: Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): influence of lecithin and nonionic emulsifier. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 61 (2005), Nr. 1-2, 77–86
- [10] SCHUBERT, M.A.; SCHICKE, B.C. ; MÜLLER-GOYMANN, C.C.: Thermal analysis of the crystallization and melting behavior of lipid matrices and lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin. In: *International Journal of Pharmaceutics* 298 (2005), Nr. 1, 242–254
- [11] SCHUBERT, M.A.; HARMS, M. ; MÜLLER-GOYMANN, C.C.: Structural investigations on lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin. In: *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 27 (2006), Nr. 2-3, 226–236
- [12] KENSIL, C.R. Kapitel: Immunomodulatory adjuvants from Quillaja saponaria In. *Immunopotentiators in Modern Vaccines* ; SCHIJNS, V. (Hrsg.) ; O'HAGAN, D. (Hrsg.): Elsevier, London, 2006, 109–122
- [13] MITRA, S. ; DUNGAN, S.R.: Micellar Properties of Quillaja Saponin. 1. Effects of Temperature, Salt, and pH on Solution Properties. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (1997), Nr. 5, 1587–1595
- [14] MITRA, S. ; DUNGAN, S.R.: Micellar properties of quillaja saponin. 2. Effect of solubilized cholesterol on solution properties. In: *Colloids and Surfaces, B: Biointerfaces* 17 (2000), Nr. 2, 117–133
- [15] MOREIN, B.; SUNDQUIST, B.; HOGLUND, S.; DALSGAARD, K. ; OSTERHAUS, A.: Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. In: *Nature* 308 (1984), 457–460
- [16] ÖZEL, M.; HÖGLUND, S.; GELDERBLOM, H.R. ; MOREIN, B.: Quaternary structure of the immunostimulating complex (Iscom). In: *Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research* 102 (1989), Nr. 3, 240–248
- [17] KERSTEN, G. F.; SPIEKSTRA, A.; COEN BEUVERY, E. ; CROMMELIN, D.J.A.: On the structure of immune-stimulating saponin-lipid complexes (iscoms). In:

- Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1062 (1991), Nr. 2, 165–171
- [18] DEMANA, P.H.; DAVIES, N.M.; VOSGERAU, U. ; RADES, T.: Pseudo-ternary phase diagrams of aqueous mixtures of Quil A, cholesterol and phospholipid prepared by the lipid-film hydration method. In: *International Journal of Pharmaceutics* 270 (2004), Nr. 1-2, 229–239
- [19] GLATTER, O. (Hrsg.) ; KRATKY, O. (Hrsg.): *Small Angle X-ray Scattering*. Academic Press, London, 1982
- [20] KRATKY, O.: Die Welt der vernachlässigten Dimensionen und die Kleinwinkelstreuung der Röntgen-Strahlen und Neutronen an biologischen Makromolekülen. In: *Nova Acta Leopoldina* 55 (1983), 1–72
- [21] GUINIER, A. (Hrsg.) ; FOURNET, G. (Hrsg.): *Small-Angle Scattering of X-rays*. John Wiley & Sons Inc., New York, 1955
- [22] VOGEL, H. (Hrsg.): *Gerthsen Physik*. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1995
- [23] KRATKY, O.: Größe und Gestalt von Kolloidteilchen und Makromolekülen nach der Röntgenkleinwinkelmethode. In: *Österreichische Chemiker-Zeitung* 54 (1953), 193–202
- [24] DEBYE, P.: Zerstreuung von Röntgenstrahlen. In: *Annalen der Physik* 351 (1915), Nr. 6, 809–823
- [25] MÜLLER, K. ; GLATTER, O.: Practical aspects to the use of indirect fourier transformation methods. In: *Die Makromolekulare Chemie* 183 (1982), Nr. 2, 465–479
- [26] SOMMER, C.; PEDERSEN, J.S.; EGELHAAF, S.U.; CANNAVACCIUOLO, L.; KOHLBRECHER, J. ; SCHURTENBERGER, P.: Wormlike Micelles as "Equilibrium Polyelectrolytes": Light and Neutron Scattering Experiments. In: *Langmuir* 18 (2002), Nr. 7, 2495–2505
- [27] LUZZATI, V.; MUSTACCHI, H.; SKOULIOS, A. ; HUSSON, F.: La structure des colloïdes d'association. I. Les phases liquide-cristallines des systèmes amphiphile-eau. In: *Acta Crystallographica* 13 (1960), 660–667
- [28] LASIC, D.D.: Novel applications of liposomes. In: *Trends in Biotechnology* 16 (1998), Nr. 7, 307–321

- [29] SCHMITT, J. Kapitel: Parenterale Fetteulsionen als Arzneistoffträger In: *Pharmazeutische Technologie: Moderne Arzneiformen* ; MÜLLER, R.H. (Hrsg.) ; HILDEBRAND, G.E. (Hrsg.): Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1998, 189–194
- [30] SMITH, A. ; HUNNEYBALL, I.M.: Evaluation of poly(lactic acid) as a biodegradable drug delivery system for parenteral administration. In: *International Journal of Pharmaceutics* 30 (1986), Nr. 2-3, 215–220
- [31] MÜLLER, R.H.; MAASSEN, S.; WEYHERS, H.; SPECHT, F. ; LUCKS, J.S.: Cytotoxicity of magnetite-loaded polylactide, polylactide/glycolide particles and solid lipid nanoparticles. In: *International Journal of Pharmaceutics* 138 (1996), Nr. 1, 85–94
- [32] MÜLLER, R.H.; RÜLL, D.; RUNGE, S.; SCHULZE-FORSTER, K. ; MEHNERT, W.: Cytotoxicity of Solid Lipid Nanoparticles as a Function of the Lipid Matrix and the Surfactant. In: *Pharmaceutical Research* V14 (1997), Nr. 4, 458–462
- [33] LIMAYEM, I.; CHARCOSSET, C. ; FESSI, H.: Purification of nanoparticle suspensions by a concentration/diafiltration process. In: *Separation and Purification Technology* 38 (2004), Nr. 1, 1–9
- [34] JENNING, V. ; GOHLA, S.: Comparison of wax and glyceride solid lipid nanoparticles (SLN). In: *International Journal of Pharmaceutics* 196 (2000), 219–222
- [35] DE VRINGER, T. ; DE RONDE, H.A.G.: Preparation and Structure of a Water-in-Oil Cream Containing Lipid Nanoparticles. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 84 (1995), 466–472
- [36] BUNJES, H. ; SIEKMANN, B.: Manufacture, characterization, and applications of solid lipid nanoparticles as drug delivery systems. In: *Drugs and the Pharmaceutical Sciences* 158 (2006), 213–268
- [37] GOHLA, S.H. ; DINGLER, A.: Scaling up feasibility of the production of solid lipid nanoparticles (SLN). In: *Pharmazie* 56 (2001), Nr. 1, 61–63
- [38] CAVALLI, R.; CAPUTO, O. ; GASCO, M.R.: Solid lipospheres of doxorubicin and idarubicin. In: *International Journal of Pharmaceutics* 89 (1993), R9–R12

- [39] FRIEDRICH, I.; REICHL, S. ; MÜLLER-GOYMANN, C.C.: Drug release and permeation studies of nanosuspensions based on solidified reverse micellar solutions (SRMS). In: *International Journal of Pharmaceutics* 305 (2005), Nr. 1-2, 167–175
- [40] JENNING, V.; SCHÄFER-KORTING, M. ; GOHLA, S.: Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties. In: *Journal of Controlled Release* 66 (2000), 115–126
- [41] MÜLLER, R.H.; RADTKE, M. ; WISSING, S.A.: Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. In: *International Journal of Pharmaceutics* 242 (2002), 121–128
- [42] JENNING, V.; THÜNEMANN, A.F. ; GOHLA, S.H.: Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. In: *International Journal of Pharmaceutics* 199 (2000), 167–177
- [43] JORES, K.; MEHNERT, W. ; MÄDER, K.: Physicochemical Investigations on Solid Lipid Nanoparticles and on Oil-Loaded Solid Lipid Nanoparticles: A Nuclear Magnetic Resonance and Electron Spin Resonance Study. In: *Pharmaceutical Research* 20 (2003), 1274–1283
- [44] JORES, K.; MEHNERT, W.; DRECHSLER, M.; BUNJES, H.; JOHANN, C. ; MÄDER, K.: Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. In: *Journal of Controlled Release* 95 (2004), Nr. 2, 217–227
- [45] JORES, K.; HABERLAND, A.; WARTEWIG, S.; MÄDER, K. ; MEHNERT, W.: Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Oil-Loaded SLN Studied by Spectrofluorometry and Raman Spectroscopy. In: *Pharmaceutical Research* V22 (2005), Nr. 11, 1887–1897
- [46] MEHNERT, W. ; MÄDER, K.: Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 47 (2001), Nr. 2-3, 165–196
- [47] HAGEMANN, J.W. Kapitel: thermal behavior and polymorphism of acylglycerides In: *Surfactant science series*. Bd. 31: *crystallization and polymorphism of fats and fatty acids* ; GARTI, N (Hrsg.) ; SATO, K. (Hrsg.): Marcel Dekker, New York, 1988, 9–95

- [48] ÜNER, M.: Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. In: *Pharmazie* 61 (2006), 375–386
- [49] BUNJES, H.; WESTESEN, K. ; KOCH, M.H.J.: Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles. In: *International Journal of Pharmaceutics* 129 (1996), Nr. 1-2, 159–173
- [50] BUNJES, H. ; KOCH, M.H.J.: Saturated phospholipids promote crystallization but slow down polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles. In: *Journal of Controlled Release* 107 (2005), Nr. 2, 229–243
- [51] BUNJES, H.; KOCH, M.H.J. ; WESTESEN, K.: Influence of emulsifiers on the crystallization of solid lipid nanoparticles. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 92 (2003), Nr. 7, 1509–1520
- [52] BUNJES, H.; KOCH, M.H.J. ; WESTESEN, K.: Effect of Particle Size on Colloidal Solid Triglycerides. In: *Langmuir* 16 (2000), Nr. 12, 5234–5241
- [53] WESTESEN, K. ; WEHLER, T.: Physicochemical characterization of a model intravenous oil-in-water emulsion. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 81 (1992), 777–786
- [54] SIEKMANN, B. ; WESTESEN, K.: Submicron lipid suspensions (solid lipid nanoparticles) versus lipid nanoemulsions: similarities and differences. In: *Drug Targeting and Delivery* 9 (1998), 205–218
- [55] HEIATI, H.; PHILLIPS, N.C. ; TAWASHI, R.: Evidence for phospholipid bilayer formation in solid lipid nanoparticles formulated with phospholipid and triglyceride. In: *Pharmaceutical Research* 13 (1996), 1406–1410
- [56] RADTKE, M.: *Grundlegende Untersuchungen zur Arzneistoffinkorporation, -freisetzung und Struktur von SLN und NLC*, FU Berlin, Dissertation, 2003
- [57] JENNING, V.; MÄDER, K. ; GOHLA, S.H.: Solid lipid nanoparticles (SLN) based on binary mixtures of liquid and solid lipids: a ^1H -NMR study. In: *International Journal of Pharmaceutics* 205 (2000), 15–21
- [58] GASCO, M.R.: *Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution*. 1993. – Patent No.: US 5250236 A 19931005

- [59] SIEKMANN, B. ; WESTESEN, K.: Investigations on solid lipid nanoparticles prepared by precipitation in o/w emulsions. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 42 (1996), Nr. 2, 104–109
- [60] SJÖSTRÖM, B. ; BERGENSTÅHL, B.: Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions I. Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate. In: *International Journal of Pharmaceutics* 88 (1992), Nr. 1-3, 53–62
- [61] SCHUBERT, M.A. ; MÜLLER-GOYMANN, C.C.: Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles—evaluation of the method and process parameters. In: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 55 (2003), Nr. 1, 125–131
- [62] SHEKUNOV, B.Y.; CHATTOPADHYAY, P. ; HUFF, R.W.: *Method for producing solid-lipid composite drug particles*. 2006. – Patent No.: US 2006008531
- [63] BALLMANN, C.: *Entwicklung und Charakterisierung halbfester Zubereitungen auf der Basis von Triglyceriden*, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Dissertation, 2006
- [64] GHYCZY, M. (Hrsg.) ; NIEMANN, R. (Hrsg.): *Haut und Liposomen*. Nattermann Phospholipid GmbH, Köln, 1992
- [65] ROWE, R. (Hrsg.); SHESKEY, P.J. (Hrsg.) ; OWEN, S.C. (Hrsg.): *Handbook of pharmaceutical excipients*. 5. Pharmaceutical Press ; Washington, DC, 2006
- [66] GLATTER, O. ; GRUBER, K.: Indirect transformation in reciprocal space: desmearing of small-angle scattering data from partially ordered systems. In: *Journal of Applied Crystallography* 26 (1993), 512–518
- [67] HARMS, M.; SCHUBERT, M.A. ; MÜLLER-GOYMANN, C.C.: X-Ray Characterization of aqueous lipid nanodispersions. In: *Proceedings of the International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Nuremberg, March 15-18, 2004*, 633–634
- [68] ISRAELACHVILI, J.N.; MITCHELL, D.J. ; NINHAM, B.W.: Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. In: *Journal of the Chemical Society / Faraday Transactions : 2* 72 (1976), 1525–1568
- [69] ISRAELACHVILI, J.N.; MITCHELL, D.J. ; NINHAM, B.W.: Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. In: *Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes* 470 (1977), 185–201

- [70] ISRAELACHVILI, J.N.; MARCELJA, S. ; HORN, R.G.: Physical principles of membrane organization. In: *Quarterly Reviews of Biophysics* 13 (1980), 121–200
- [71] MEHNERT, W.; ZUR MÜHLEN, A.; DINGLER, A.; WEYHERS, H. ; MÜLLER, R.H.: Solid lipid nanoparticles. A novel carrier system for cosmetics and pharmaceuticals. 2nd communication. Drug incorporation, drug liberation, sterilization. In: *Pharmazeutische Industrie* 59 (1997), 511–514
- [72] ATKINS, P.W. (Hrsg.): *Physikalische Chemie*. 2. VCH, Weinheim, 1996
- [73] LIU, L.; JOHN, V.T.; MCPHERSON, G.; MASKOS, K. ; BOSE, A.: ^{31}P and ^1H NMR as Probes of Domain Alignment in a Rigid Crystalline Surfactant Mesophase. In: *Langmuir* 21 (2005), Nr. 9, 3795–3801
- [74] FRASER, P.E.; MOSCARELLO, M.A.; RAND, R.P. ; DEBER, C.M.: Spontaneous vesicularization of myelin lipids is counteracted by myelin basic protein. In: *Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes* 863 (1986), Nr. 2, 282–288
- [75] PRETSCH, E. (Hrsg.); CLERC, T. (Hrsg.); SEIBL, J. (Hrsg.) ; SIMON, W. (Hrsg.): *Anleitungen für die chemische Laboratoriumspraxis*. Bd. 15: *Tafeln zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden*. Springer, Berlin, 1986
- [76] FRINGELI, U.P. ; GÜNTARD, H.H.: Infrared membrane spectroscopy. In: *Molecular biology, biochemistry and biophysics* 31 (1981), 270–332
- [77] MACKEBEN, S.: *Inverse Lecithin-Spaghettizellen als Arzneistoffträger : Eine physiko-chemische Charakterisierung durch diffuse Röntgenkleinwinkelstreuung*, TU Braunschweig, Dissertation, 2003
- [78] GRDADOLNIK, J.; KIDRIC, J. ; HADZI, D.: Hydration of phosphatidylcholine reverse micelles and multilayers – an infrared spectroscopic study. In: *Chemistry and Physics of Lipids* 59 (1991), Nr. 1, 57–68
- [79] YOSHIKI, Y.; KUDOU, S. ; OKUBO, K.: Relationship between chemical structures and biological activities of triterpenoid saponins from soybean. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 62 (1998), 2291–2299
- [80] FRANCIS, G.; KEREM, Z.; MAKKAR, H.P.S. ; BECKER, K.: The biological action of saponins in animal systems: a review. In: *British Journal of Nutrition* 88 (2002), 587–605

- [81] BANGHAM, A.D. ; HORNE, R.W.: Action of Saponin on Biological Cell Membranes. In: *Nature* 196 (1962), Nr. 4858, 952–953
- [82] GLAUERT, A.M.; DINGLE, J.T. ; LUCY, J.A.: Action of Saponin on Biological Cell Membranes. In: *Nature* 196 (1962), Nr. 4858, 953–955
- [83] GÖGELEIN, H. ; HÜBY, A.: Interaction of saponin and digitonin with black lipid membranes and lipid monolayers. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 773 (1984), Nr. 1, 32–38
- [84] AUTHI, K.S.; RAO, G. H.; EVENDEN, B.J. ; CRAWFORD, N.: Action of guanosine 5'-[b-thio]diphosphate on thrombin-induced activation and calcium mobilization in saponin-permeabilized and intact human platelets. In: *Biochemical Journal* 255 (1988), 885–893
- [85] SEEMAN, P.; CHENG, D. ; ILES, G.H.: Structure of membrane holes in osmotic and saponine hemolysis. In: *Journal of Cell Biology* 56 (1973), Nr. 2, 519–527
- [86] SEEMAN, P.: Ultrastructure of membrane lesions in immune lysis, osmotic lysis, and drug-induced lysis. In: *Federation Proceedings* 33 (1974), 2116–2124
- [87] HU, M.; KONOKI, K.i ; TACHIBANA, K.: Cholesterol-independent membrane disruption caused by triterpenoid saponins. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1299 (1996), Nr. 2, 252–258
- [88] RAJPUT, Z.; HU, S.; XIAO, C. ; ARIJO, A.: Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. In: *Journal of Zhejiang University - Science B* 8 (2007), Nr. 3, 153–161
- [89] ODA, K.i; MATSUDA, H.; MURAKAMI, T.i; KATAYAMA, S.; OHGITANI, T.i ; YOSHIKAWA, M.: Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. In: *Biological Chemistry* 381 (2000), 67–74
- [90] BARR, I.G.; SJÖLANDER, A. ; COX, J.C.: ISCOMs and other saponin based adjuvants. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 32 (1998), 247–271
- [91] DALSGAARD, K.: Saponin adjuvants. III. Isolation of a substance from Quillaja saponaria with adjuvant activity in foot-and-mouth disease vaccines. In: *Archiv fuer die Gesamte Virusforschung* 44 (1974), 243–254
- [92] KENSIL, C.R.: Saponins as vaccine adjuvants. In: *Critical Reviews In Therapeutic Drug Carrier Systems* 13 (1996), 1–55

- [93] HIGUCHI, R.; TOKIMITSU, Y. ; KOMORI, T.: An acylated triterpenoid saponin from *Quillaja saponaria*. In: *Phytochemistry* 27 (1988), Nr. 4, 1169–1172
- [94] GUO, S.; KENNE, L.; LUNDGREN, L.N.; RONNBERG, B. ; SUNDQUIST, B.G.: Triterpenoid saponins from *Quillaja saponaria*. In: *Phytochemistry* 48 (1998), Nr. 1, 175–180
- [95] GUO, S. ; KENNE, L.: Characterization of some O-acetylated saponins from *Quillaja saponaria* Molina. In: *Phytochemistry* 54 (2000), Nr. 6, 615–623
- [96] GUO, S.; FALK, E.; KENNE, L.; RONNBERG, B. ; SUNDQUIST, B.G.: Triterpenoid saponins containing an acetylated branched -fucosyl residue from *Quillaja saponaria* Molina. In: *Phytochemistry* 53 (2000), Nr. 8, 861–868
- [97] LIU, G.; ANDERSON, C.; SCALTRETO, H.I.; BARBON, J. ; KENSIL, C.R.: QS-21 structure/function studies: effect of acylation on adjuvant activity. In: *Vaccine* 20 (2002), Nr. 21-22, 2808–2815
- [98] JACOBSEN, N.E.; FAIRBROTHER, W.J.; KENSIL, C.R.; LIM, A.; WHEELER, D.A. ; POWELL, M.F.: Structure of the saponin adjuvant QS-21 and its base-catalyzed isomerization product by ¹H and natural abundance ¹³C NMR spectroscopy. In: *Carbohydrate Research* 280 (1996), Nr. 1, 1–14
- [99] KENSIL, C.R.; WU, J.Y.; ANDERSON, C.A.; WHEELER, D.A. ; AMSDEN, J.: QS-21 and QS-7: purified saponin adjuvants. In: *Developments In Biological Standardization* 92 (1998), 41–47
- [100] PILLION, D.J.; RECCHIA, J.; WANG, P.; MARCIANI, D.J. ; KENSIL, C.R.: DS-1, a modified *Quillaja* saponin, enhances ocular and nasal absorption of insulin. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 84 (1995), Nr. 11, 1276–1279
- [101] CLELAND, J.L.; KENSIL, C.R.; LIM, A.; JACOBSEN, N.E.; BASA, L.; SPELLMAN, M.; WHEELER, D.A.; WU, J.Y. ; POWELL, M.F.: Isomerization and formulation stability of the vaccine adjuvant QS-21. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85 (1996), Nr. 1, 22–28
- [102] DEMANA, P.H.; DAVIES, N.M.; BERGER, B.; VOSGERAU, U. ; RADES, T.: A comparison of pseudo-ternary diagrams of aqueous mixtures of Quil A, cholesterol and phospholipid prepared by lipid-film hydration and dialysis. In: *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 56 (2004), 573–580

- [103] LÖVGREN, K. ; MOREIN, B.: The requirement of lipids for the formation of immunostimulating complexes (iscoms). In: *Biotechnology and Applied Biochemistry* 10 (1988), 161–172
- [104] OAKENFULL, D.: Aggregation of saponins and bile acids in aqueous solution. In: *Australian Journal of Chemistry* 39 (1986), 1671–1683
- [105] KENSIL, C.R.; SOLTYSIK, S.; PATEL, U. ; MARCIANI, D.J. Kapitel: Structure/function relationship in adjuvants from Quillaja saponaria Molina In: *Vaccines 92: Modern Approaches to New Vaccines Including Prevention of AIDS* ; BORWN, F. (Hrsg.); CHANOCK, R.M. (Hrsg.); GINSBERG, H.S. (Hrsg.) ; LERNER, R.A. (Hrsg.): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992, 35–40
- [106] DALSGAARD, K.: Adjuvants. In: *Veterinary Immunology and Immunopathology* 17 (1987), Nr. 1-4, 145–152
- [107] KENSIL, C.R.; PATEL, U.; LENNICK, M. ; MARCIANI, D.: Separation and characterization of saponins with adjuvant activity from Quillaja saponaria Molina cortex. In: *Journal of Immunology* 146 (1991), Nr. 2, 431–437
- [108] PEARSE, M.J. ; DRANE, D.: ISCOMATRIX(R) adjuvant for antigen delivery. In: *Advanced Drug Delivery Reviews* 57 (2005), Nr. 3, 465–474
- [109] KENSIL, C.R. ; KAMMER, R.: QS-21: a water-soluble triterpene glycoside adjuvant. In: *Expert Opinion on Investigational Drugs* 7 (1998), Nr. 9, 1475–1482
- [110] KENSIL, C.R.; SOLTYSIK, S.; WHEELER D, A. ; J.Y., Wu: Structure/function studies on QS-21, a unique immunological adjuvant from Quillaja saponaria. In: *Advances In Experimental Medicine and Biology* 404 (1996), 165–172
- [111] SOLTYSIK, S.; WU, J.Y.; RECCHIA, J.; WHEELER, D.A.; NEWMAN, M.J.; COUGHLIN, R.T. ; KENSIL, C.R.: Structure/function studies of QS-21 adjuvant: assessment of triterpene aldehyde and glucuronic acid roles in adjuvant function. In: *Vaccine* 13 (1995), Nr. 15, 1403–1410
- [112] MOREIN, B.: The iscom antigen-presenting system. In: *Nature* 332 (1988), Nr. 6161, 287–288
- [113] COPLAND, M.J.; RADES, T. ; DAVIES, N.M.: Hydration of lipid films with an aqueous solution of Quil A: a simple method for the preparation of immune-stimulating complexes. In: *International Journal of Pharmaceutics* 196 (2000), Nr. 2, 135–139

- [114] KERSTEN, G.F.A. ; CROMMELIN, D.J.A.: Liposomes and ISCOMS as vaccine formulations. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* 1241 (1995), Nr. 2, 117–138
- [115] LENDEMANS, D.G.; MYSCHIK, J.; HOOK, S. ; RADES, T.: Cationic cage-like complexes formed by DC-cholesterol, Quil-A, and phospholipid. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94 (2005), Nr. 8, 1794–1807
- [116] LENDEMANS, D.G.; EGERT, A.M.; HOOK, S. ; RADES, T.: Cage-like complexes formed by DOTAP, Quil-A and cholesterol. In: *International Journal of Pharmaceutics* 332 (2007), Nr. 1-2, 192–195
- [117] FIEDLER, H.P. (Hrsg.): *Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete*. Editio Cantor Verlag, Aulendorf, 1989
- [118] PROVENCHER, S.W.: CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. In: *Computer Physics Communications* 27 (1982), Nr. 3, 229–242
- [119] KÖHLER, K.; FÖRSTER, G.; HAUSER, A.; DOBNER, B.; HEISER, U.F.; ZIETHE, F.; RICHTER, W.; STEINIGER, F.; DRECHSLER, M.; STETTIN, H. ; BLUME, A.: Self-Assembly in a Bipolar Phosphocholine-Water System: The Formation of Nanofibers and Hydrogels. In: *Angewandte Chemie, International Edition* 43 (2004), Nr. 2, 245–247
- [120] KÖHLER, K.; FÖRSTER, G.; HAUSER, A.; DOBNER, B.; HEISER, U.F.; ZIETHE, F.; RICHTER, W.; STEINIGER, F.; DRECHSLER, M.; STETTIN, H. ; BLUME, A.: Temperature-Dependent Behavior of a Symmetric Long-Chain Bolaamphiphile with Phosphocholine Headgroups in Water: From Hydrogel to Nanoparticles. In: *Journal of the American Chemical Society* 126 (2004), Nr. 51, 16804–16813
- [121] KÖHLER, K.; MEISTER, A.; FÖRSTER, G.; DOBNER, B.; DRESCHER, S.; ZIETHE, F.; RICHTER, W.; STEINIGER, F.; DRECHSLER, M.; HAUSE, G. ; BLUME, A.: Conformational and thermal behavior of a pH-sensitive bolaform hydrogelator. In: *Soft Matter* 2 (2006), 77–86
- [122] LEBEDEV, D.V.; BAITIN, D.M.; ISLAMOV, A.K.; KUKLIN, A.I.; SHALGUEV, V.K.; LANZOV, V.A. ; ISAEV-IVANOV, V.V.: Analytical model for determination of parameters of helical structures in solution by small angle scattering: comparison of RecA structures by SANS. In: *FEBS Letters* 537 (2003), Nr. 1-3, 182–186

- [123] FEIGIN, L.A. (Hrsg.); SVERGUN, D.I. (Hrsg.) ; TAYLOR, G.W. (Hrsg.): *Structure analysis by small-angle X-ray and neutron scattering*. Plenum Press, New York, 1987
- [124] HE, L.Z.; GARAMUS, V.M.; FUNARI, S.S.; MALFOIS, M.; WILLUMEIT, R. ; NIEMEYER, B.: Comparison of Small-Angle Scattering Methods for the Structural Analysis of Octyl- β -maltopyranoside Micelles. In: *Journal of Physical Chemistry B* 106 (2002), Nr. 31, 7596–7604
- [125] RADES, T.: *mündliche Auskunft*. – 2006
- [126] CHUNG, D.S.; BENEDEK, G.B.; KONIKOFF, F.M. ; DONOVAN, J.M.: Elastic Free Energy of Anisotropic Helical Ribbons as Metastable Intermediates in the Crystallization of Cholesterol. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (1993), Nr. 23, 11341–11345
- [127] ZASTAVKER, Y.V.; ASHERIE, N.; LOMAKIN, A.; PANDE, J.; DONOVAN, J.M.; SCHNUR, J.M. ; BENEDEK, G.B.: Self-assembly of helical ribbons. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (1999), Nr. 14, 7883–7887
- [128] BRIZARD, A.; ODA, R. ; HUC, I.: Chirality Effects in Self-assembled Fibrillar Networks. In: *Topics in Current Chemistry* 256 (2005), 167–218
- [129] NAKASHIMA, N.; ASAKUMA, S. ; KUNITAKE, T.: Optical microscopic study of helical superstructures of chiral bilayer membranes. In: *Journal of the American Chemical Society* 107 (1985), Nr. 2, 509–510
- [130] ZHOU, J.; DEYHIM, A.; KRUEGER, S. ; GREGURICK, S.K.: LORES: Low resolution shape program for the calculation of small angle scattering profiles for biological macromolecules in solution. In: *Computer Physics Communications* 170 (2005), Nr. 2, 186–204
- [131] PAEPENMÜLLER, T.: *mündliche Auskunft*. – 2007
- [132] MYSCHIK, J.; LENDEMANS, D.G.; MCBURNEY, W.T.; DEMANA, P.H.; HOOK, S. ; RADES, T.: On the preparation, microscopic investigation and application of ISCOMs. In: *Micron* 37 (2006), Nr. 8, 724–734
- [133] LITRELL, K.; URBAN, V.; TIEDE, D. ; THIYAGARAJAN, P.: Solution structure of detergent micelles at conditions relevant to membrane protein crystallization. In: *Journal of Applied Crystallography* 33 (2000), 577–581

-
- [134] SCHMIDT, P.: Small-angle scattering studies of disordered, porous and fractal systems. In: *Journal of Applied Crystallography* 24 (1991), Nr. 5, 414–435
- [135] MÜLLER, M.; MACKEBEN, S. ; MÜLLER-GOYMANN, C.C.: Physicochemical characterisation of liposomes with encapsulated local anaesthetics. In: *International Journal of Pharmaceutics* 274 (2004), Nr. 1-2, 139–148